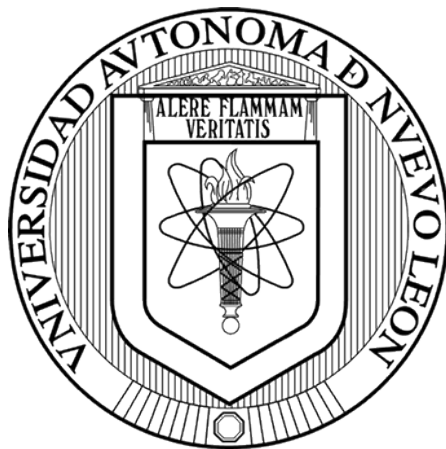


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA E INMUNOLOGÍA



**Prevalencia y genotipos del Virus del Papiloma Humano, infección por Virus de Epstein-Barr
y expresión de p16^{INK4a} y pRb en Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil de pacientes de una
unidad médica de tercer nivel del noreste de México**

presentado por

L.B.G. Juan Alonso Escalante Cortes

Como requisito para obtener el grado de

Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

**Prevalencia y genotipos del Virus del Papiloma Humano, infección por Virus de Epstein-Barr
y expresión de p16^{INK4a} y pRb en Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil de pacientes de una
unidad médica de tercer nivel del noreste de México**

COMITÉ DE TESIS

Dr. José Manuel Vázquez Guillén
Presidente

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales
Secretario

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Vocal

Dra. Vianey González Villasana
Vocal

Dra. Ana Carolina Martínez Torres
Vocal

Prevalencia y genotipos del Virus del Papiloma Humano, infección por Virus de Epstein-Barr y expresión de p16^{INK4a} y pRb en Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México bajo la dirección del Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo y el Dr. José Manuel Vázquez Guillén.

Dr. José Manuel Vázquez Guillén

Director

Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo

Director Externo

Dedicatoria

A Dios, por darme vida y las bendiciones que me ha regalado a lo largo de ella, por darme las herramientas que necesito para superarme personalmente y poder ser un pilar de apoyo para mi familia y sociedad.

Muchísimo es lo que tengo que agradecerle a la persona más importante en mi vida durante estos dos años de maestría, te agradezco por ser mi mejor amiga, motivación, y por ayudarme a ser la mejor versión de mí mismo, y a tener grandes metas que cumplir. Gracias por estar en mi vida.

Gracias a mis padres Juan Escalante Escalante y Laura Alicia Cortes Ríos, por todo el esfuerzo y dedicación que le dieron a mi educación. Me apoyaron a mantenerme enfocado en el trabajo y enfocado, sin ustedes nunca hubiera podido llegar a donde estoy ahora.

Gracias a mis hermanas Aurora y Andrea Escalante Cortes por su cariño y enorme apoyo y a mi sobrina Regina Reyes Escalante por ser la alegría de cada día en la familia.

Gracias a mis abuelos por su incondicional apoyo y cariño. En especial gracias a mi abuelo Alonso Cortes Ramos, me enseñaste a ser una buen ser humano, con valores y determinación. Te dedico esta segunda tesis con mucho cariño, quisiera que estuvieras aquí para verme cumplir mis metas, pero sé que estás conmigo a cada paso que doy, gracias abuelo.

A mi maestro José Manuel Vázquez Guillén, por su confianza, consejos. Gracias por ayudarme a completar mi formación profesional y compartir tu conocimiento conmigo, pero sobre todo muchas gracias por tu amistad.

Gracias por el apoyo a lo largo del desarrollo de este proyecto a mis compañeros de laboratorio Mónica Alonzo, Andrea Huerta, Aldo Flores, Alondra Alanís, Elizabeth Aguirre, Melissa Mellado y Melanie Marmolejo, su ayuda contribuyó en gran medida a la realización este trabajo.

El presente trabajo se realizó gracias a las facilidades prestadas por el **Laboratorio de Inmunología y Virología** de la Facultad de Ciencias Biológicas – UANL.



LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo fue desarrollado en:

- La Unidad Médica de Alta Especialidad, Hospital de Especialidades No. 25 y la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 23, Hospital de Ginecología y Obstetricia “Dr. Ignacio Morones Prieto”, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) del I.M.S.S., Monterrey, Nuevo León, México con el Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo como Director Externo.
- El Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. José Manuel Vázquez Guillén.
- La Unidad de Genómica del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León con la asesoría de la Q.C.B Patricia Villarreal Quiroga y la M.C. Bianka Dianey Camacho Zamora.
- Medicina Diagnostica S.A. de C.V. Servicios Integrales de Análisis Clínicos, Citopatología, Anatomía Patológica y Oncología Diagnostica. Av. Simón Bolívar 1333, Colonia Mitras Centro, Monterrey, N. L., CP 64460, México con el Dr. Ángel Zavala Pompa como asesor especialista.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la Universidad Autónoma de Nuevo León por medio del proyecto SA791-19 a cargo del Dr. José Manuel Vázquez Guillén.

El Dr. Gerardo C. Palacios Saucedo fue apoyado por una Beca de Excelencia en Investigación por la Fundación IMSS A.C.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	iv
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Angiofibroma nasofaríngeo juvenil	2
2.1.1 Etiología y patogénesis	2
2.1.2 Histopatología	3
2.1.3 Clasificación.....	4
2.1.4 Manifestación clínica.....	4
2.2 Receptores tipo Toll y virus.....	5
2.3 VPH y su relación con los tumores de cabeza y cuello	7
2.4 VEB y su relación con los tumores de cabeza y cuello	9
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	13
5. OBJETIVOS.....	14
5.1 Objetivo general	14
5.2 Objetivos particulares.....	14
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
6.1 Diseño del estudio.	15
6.2 Conjunción del grupo de estudio.	15
6.3 Extracción de ADN.....	15
6.4 Detección y genotipificación del VPH.....	16
6.4.1 Amplificación.....	16
6.4.2 Hibridación y revelado.....	17
6.4.3 Interpretación de resultados.....	17
6.5 Detección del VEB.....	20
6.5.1 Diseño de ensayos.	20

6.5.2 Preparación de las reacciones de amplificación.	20
6.6 Evaluación de expresión de p16 ^{INK4a} y pRb.....	21
6.6.1 Cortes y montaje.....	21
6.6.2 Tinción con hematoxilina y eosina (HyE).....	21
6.6.3 Tinción inmunohistoquímica de p16 ^{INK4a} y pRb.	22
6.6.4 Interpretación de la expresión de p16 ^{INK4a} y pRb.....	23
6.7 Análisis estadístico.	23
7. RESULTADOS.....	24
7.1 Población incluida en el estudio.	24
7.2 Aislamiento de ADN.....	25
7.3 Detección y genotipificación del VPH.....	25
7.4 Estandarización del ensayo de qPCR para la detección del VEB.....	25
7.5 Detección del VEB.....	28
7.6 Análisis de la prevalencia del VPH, VPH-AR y VEB en ANJ con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.	28
7.7 Evaluación de la expresión de p16 ^{INK4a} y pRb en ANJ.....	30
7.8 Evaluación de la expresión de pRb y p16 ^{INK4a} en ANJ con respecto a las características clínico-histopatológicas.	39
7.9 Análisis de la expresión de pRb y p16 ^{INK4a} en ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.....	40
8. DISCUSIÓN.....	44
9. CONCLUSIONES.....	49
10. REFERENCIAS	50
11. RESUMEN BIOGRÁFICO.....	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1. Expresión de Receptores Tipo Toll (TLR), localización y ligandos en patógenos.....	6
2. Condiciones de amplificación por PCR de la región L1 del VPH empleando los cebadores SPF10 del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Kit II (Innogenetics, Bélgica).....	16
3. Criterios de interpretación de los ensayos de hibridación en tira (LiPA) del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Kit (Innogenetics, Bélgica).....	18
4. Guía para la identificación de genotipos del VPH en los ensayos de hibridación en tira (LiPA) del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II (Innogenetics, Bélgica).....	19
5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de la región LMP2 del VEB..	20
6. Información clínica de los 24 pacientes con ANJ.....	24
7. Información clínica de 6 pacientes incluidos como casos control para la evaluación de la infección por VPH y VEB, y la expresión de p16 INK4a y pRb en ANJ	25
8. Infección por VPH y VEB en 24 pacientes con ANJ.....	26
9. Prevalencia de la infección por VPH y sus genotipos, así como del VEB, en 24 pacientes con ANJ y sus características clínicas.....	26
10. Prevalencia de la infección por VPH y sus genotipos, así como del VEB, en 24 pacientes con ANJ y sus características clínicas.....	29
11. Evaluación de la expresión de p16INK4a y pRb en ANJ.....	30
12. Evaluación de la expresión de pRb con respecto a características clínico-histopatológicas.....	39
13. Evaluación de la expresión de p16INK4a con respecto a características clínico-histopatológicas.....	40
14. Expresión e intensidad de pRb en 23 casos de ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.....	42
15. Expresión e intensidad de p16INK4a en 20 casos de ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Esquema de los dominios de un TLR. Inicia con el dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR), el dominio transmembranal TM y un dominio intracelular homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina (IL)-1.....	5
2. Representación esquemática de la organización del genoma de ADN circular del VPH.....	7
3. Organización del genoma del VEB en episoma de ADN de doble cadena.	10
4. Localización de las sondas específicas en la tira del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II. La parte superior de la tira presenta una línea de marcado para la orientación	19
5. Secuencia del bloque sintético de ADN diseñado para emplearse como control positivo de amplificación del VEB. En negritas y con resaltado gris se indica el amplicón del VEB	21
6. Curva de amplificación de las diluciones 1E-3, 1E-5, 1E-6, 1E-9 y 1E-11 del bloque sintético de ADN	27
7. Gráfica de regresión para la determinación del límite de detección en los ensayos de diagnóstico. En la gráfica se muestra una eficiencia de reacción de 0.94 para el VEB	27
8. Tinción IHQ para p16INK4a en ANJ del paciente No. 11. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16INK4a por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16INK4a (++) por IHQ	31
9. Tinción IHQ para p16INK4a en ANJ del paciente No. 12. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16INK4a por IHQ en carcinoma de cérvix C) Expresión nuclear de p16INK4a (+) por IHQ	32
10. Tinción IHQ para p16INK4a en ANJ del paciente No. 16. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16INK4a por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16INK4a (+) por IHQ	33
11.	

	Tinción IHQ para p16INK4a en ANJ del paciente No. 19. El tumor es positivo para VPH 11 y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16INK4a por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16INK4a (+++) por IHQ	34
12.	Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 11. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++++) por IHQ	35
13.	Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 12. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++) por IHQ	36
14.	Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 16. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++) por IHQ	37
15.	Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 19. El tumor es positivo para VPH 11 y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++++) por IHQ	38

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μL	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonulceico
ADNh	ADN humano
ANJ	Angiofibroma nasofaríngeo juvenil
ARN	Ácido ribonucleico
Cdk4	Quinasa dependiente de ciclina 4
CECC	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello
CpG	Regiones del DNA donde un nucleótido de citosina es seguido por guanina
DAB	Diaminobenzidina
FFyEP	Fijados en formalina y embebidos en parafina
h	Horas
HHV-8	Herpes Virus-8
HyE	Hematoxilina y Eosina
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IMSS	Instituto Mexicano del Seguro Social
LB	Linfoma de Burkitt
LMP1	Proteína latente de membrana 1
LMP2	Proteína latente de membrana 2
LRR	Repeticiones ricas en leucinas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ND	No determinado
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
No.	Número
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
pb	Pares de bases
PBS	Solución salina tamponada con fosfato

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
pRb	Proteína retinoblastoma
pRb-P	pRb fosforilado
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
TLR	Receptor tipo toll
TM	Transmembranal
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UMAE	Unidad médica de alta especialidad
VEB	Virus de Epstein-Barr
VPH	Virus del papiloma humano
VPH-AR	Virus de papiloma humano de alto riesgo
µm	Micrómetros

RESUMEN

El Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil (ANJ) es un tumor nasofaríngeo benigno altamente vascularizado que representa del 0.05% al 0.5% de los tumores de la cabeza y el cuello, se presenta típicamente en varones de entre los 10 y 24 años. A pesar de ser una neoplasia benigna, conlleva una alta morbimortalidad por su patrón de crecimiento invasivo y la epistaxis que provoca. Existen múltiples teorías sobre la génesis de esta patología, sin embargo, aún es motivo de controversia. En los últimos años se ha identificado la participación del Virus del Papiloma Humano (VPH) y del Virus de Epstein-Barr (VEB) en diversos tumores de la cabeza y el cuello, y a sus oncoproteínas se les ha reportado alterando la función de las proteínas p16^{INK4a} y pRb, que son importantes efectoras del ciclo celular. En este estudio se evaluó la prevalencia y los genotipos del VPH, la infección por VEB, así como la expresión de p16^{INK4a} y pRb en ANJ de pacientes de una unidad médica de tercer nivel de atención del noreste de México. Se incluyeron especímenes fijados en formalina y embebidos en parafina (FFyEP) de ANJ diagnosticados en el periodo del 1 de enero del 2012 hasta el 31 de diciembre del 2017 por el Departamento de Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Se eliminaron muestras con necrosis extensa, con tejido histológicamente no viable en más del 50% de la laminilla, con material no útil por inadecuado procesamiento histológico, y muestras de pacientes con expediente clínico no disponible. La presencia y el genotipo del VPH fue analizada mediante el *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II* (Innogenetics, Bélgica) y la detección del ADN del VEB mediante ensayos de qPCR. Para la detección de los niveles de expresión de las proteínas de supresión tumoral p16^{INK4a} y pRb se realizó mediante inmunohistoquímica con anticuerpos Anti-CDKN2A/p16^{INK4a} y Anti-Rb (Abcam, Cambridge, UK) con el apoyo especializado de dos médicos patólogos. La información sobre las características clínicas y sociodemográficas de los pacientes incluidos fue obtenida mediante indagatoria en sus expedientes clínicos. Como grupo control se incluyeron especímenes de glándulas adenoides FFyEP del banco de tumores que fueron extirpadas a pacientes por condiciones distintas a ANJ.

ABSTRACT

Juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA) is a highly vascularized benign nasopharyngeal tumor that accounts for 0.05% to 0.5% of all head and neck tumors, typically occurs in males between 10 and 24 years. Despite being a benign neoplasm, it comes with high morbidity and mortality due to its invasive growth pattern and epistaxis. There are multiple theories in the genesis of this pathology, however it is still impossible to elucidate. In recent years, the tumorigenic effect of Human Papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr Virus (EBV) has been identified in various head and neck tumors, and its associated oncoproteins have been reported altering the function of p16^{INK4a} and pRb proteins, which are important effector of the cell cycle. In this study, the prevalence and genotypes of the Human Papillomavirus, Epstein-Barr Virus infection, as well as the expression of p16^{INK4a} and pRb proteins in patients of a third level medical unit in northeastern Mexico were evaluated. Formalin fixed and paraffin embedded (FFPE) specimens of JNA diagnosed from January 1st 2012, until on December 31 2017, by the Departamento de Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). Samples with extensive necrosis, with histologically non-viable tissue in more than 50% of the slide, with non-useful material due to inadequate histological processing, and/or samples from patients whose file is not available in the hospital file, were removed from the study. The presence and genotype of HPV was analyzed using INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II (Innogenetics, Bélgica) and detection of EBV DNA by qPCR. Detection of the expression levels of the p16 and pRb tumor suppressor proteins, immunohistochemical staining was performed with the Anti-CDKN2A/p16^{INK4a} and Anti-Rb (Abcam, Cambridge, UK) antibodies with assistance of two pathologists. Information on the clinical and sociodemographic characteristics of the patients included was obtained through inquiry in their clinical records. As a control group, specimens of adenoid glands FFPE from the tumor bank that were removed to patients for conditions other than JNA.

1. INTRODUCCIÓN

El Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil (ANJ) es un tumor benigno cuya incidencia reportada es de 0.4 casos por millón de habitantes por año y 3.7 casos por millón al limitarse a la población masculina (Glad et al., 2007). ANJ representa el 0.5% de todos los tumores de cabeza y cuello, y se presenta casi exclusivamente en hombres entre los 14 y 25 años de edad (Makhasana, Kulkarni, Vaze, & Shroff, 2016). Los síntomas más comunes son epistaxis y obstrucción nasal. El principal tratamiento para ANJ es la extracción quirúrgica del tumor (Zada, Lopes, Mukundan, & Laws, 2016). A pesar de ser considerado un tumor benigno, biológicamente es agresivo, debido principalmente a la epistaxis (Ley-Mandujano & Campos-Navarro, 2014).

Un agente biológico asociado hasta en un 60% de los tumores de cabeza y cuello es el Virus del Papiloma Humano (VPH) (Kreimer et al., 2005). Se ha encontrado en tumores localizados en la cavidad orofaríngea, oral, laringe, hipofaringe, nasofaringe, con una prevalencia principalmente del VPH-16 (Wiest, Schwarz, Enders, Flechtenmacher, & Bosch, 2002). VPH-16 es uno de ~174 tipos de VPH, de los cuales aún se siguen caracterizando nuevos continuamente (Bzhalava, Guan, Franceschi, Dillner, & Clifford, 2013; Foulongne et al., 2012). La asociación entre VPH y los tumores de cabeza y cuello es debida a la capacidad oncogénica que presenta el virus, por acción de las proteínas virales E6 y E7 (Wiest et al., 2002). E6 presenta la capacidad de unirse a p53 y marcarlo para su degradación mediante ubiquitinación, lo que lo dirige al proteasoma, para evitar la vía apoptótica y que las partículas virales mantengan su producción en la célula huésped; En el caso de E7, éste se une a la proteína retinoblastoma (pRb) y la inactiva, con la finalidad de mantener la entrada de fase G1 a fase S en la célula huésped. Esta inactivación de pRb produce una respuesta en la célula que provoca la sobreexpresión de la proteína p16^{INK4a} para tratar de inhibir la replicación celular descontrolada, pero sin lograr el objetivo debido a la completa ausencia de pRb en su forma activa (Romagosa et al., 2011; Zejnullahu & Zejnullahu, 2017)

El virus de Epstein-Barr (VEB) también se ha visto relacionado en tumores de cabeza y cuello, entre ellos en carcinoma nasofaríngeo. Es adquirido generalmente en una edad temprana y puede mantenerse como una infección asintomática del sistema linfático B. Una de las tres proteínas de membrana de VEB, LMP1 inhibe la expresión de p16^{INK4a}, lo que causa una desregulación del ciclo celular y puede llevar a la célula huésped a desarrollar un tumor (Ohtani et al., 2003; Romagosa et al., 2011; Taylor, Long, Brooks, Rickinson, & Hislop, 2015; Young & Rickinson, 2004)

2. ANTECEDENTES

2.1 Angiofibroma nasofaríngeo juvenil

El Angiofibroma nasofaríngeo juvenil (ANJ) es un tumor nasofaríngeo benigno altamente vascularizado de presentación casi exclusiva en adolescentes masculinos (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011). Representa del 0.05% al 0.5% de todos los tumores de cabeza cuello (Fatih Garca, Ari Yuca, & Yuca, 2010). Su incidencia oscila entre 1 en 5,000 a 16,000 en Estados Unidos (Bernal-sprekelsen, 2007), sin embargo, su frecuencia es mayor en países como Egipto, México e India (Chavolla-Magaña, Labra, & Huerta-Delgado, 2003); este último con reportes de un aumento en la incidencia en las últimas décadas (A. Mishra, Sachadeva, Jain, Shukla, & Pandey, 2016). Este tumor se encuentra típicamente en varones de entre 10 y 24 años, con una media de 15 años al diagnóstico (Blount, Riley, & Woodworth, 2011). En caso de que lo presente una mujer, se recomienda revisión del estudio anatomopatológico, e incluso una prueba genética (Bernal-sprekelsen, 2007).

2.1.1 Etiología y patogénesis

Existen múltiples teorías en cuanto al origen del ANJ sin embargo su patogénesis aún es incierta (Zhuo fu Liu et al., 2011). Rigertz en 1938 creía que el ANJ se originaba del periostio de la base del cráneo, Som y Neffson en 1940 proponían que las desigualdades en el crecimiento de los huesos que forman la base del cráneo resultaban en la hipertrofia del periostio subyacente en respuesta a una influencia hormonal. Bensch y Ewing en 1941 pensaron que el tumor probablemente se originaba del fibrocartilago embrionario entre el basi-esfenoides y el basi-occipital. Brunner en 1942 sugiere un origen a partir unión de la fascia faringobasilar y la fascia bucofaríngea (Girgis & Fahmy, 1973). Willis en 1953 mencionaba que este tumor no era una neoplasia, sino una clase de respuesta inflamatoria o inmunológica del organismo, con probable origen alérgico (S. C. Mishra, 2000). En 1954, Sternberg sugiere que se trata de un tipo de hemangioma relacionándolo estructuralmente con los hemangiomas hipertróficos en los niños debido a su naturaleza y tendencia a la regresión espontanea (Sternberg, 1954). Harma en 1958 lo ubicaba como una reacción hiperplásica de estructura fibroangiomatosa similar al granuloma piógeno o el granuloma gravídico (Harma, 1958). Osborn (1959) consideró que estos tumores pertenecían al grupo de las malformaciones; hizo hincapié en su similitud al tejido eréctil nasal considerándolos malformaciones de los vasos sanguíneos, es decir, hamartomas. Sugirió que la transmisión de la presión arterial a los vasos capilares produce edema y hemorragias, que a su vez provoca procesos reparativos, con la subsecuente formación de

tejido de granulación y depósito de tejido fibroso (Osborn, 1959). En 1948 Martin y Col propusieron una teoría hormonal, donde se relacionaba a este tumor con una deficiencia de la actividad androgénica o una sobreproducción de estrógenos, encontrando regresión tumoral al administrar testosterona (Martin, Ehrlich, & Abels, 1946), sin embargo en 1954 Dane sugiere que el crecimiento tumoral es el resultado de una estimulación androgénica y no estrogénica (Girgis & Fahmy, 1973); correlacionándose con los hallazgos de Zhuofu Liu y col. donde corroboran la presencia de receptores estrogénicos alfa en 92.9% de los casos y receptores estrogénicos beta en 91.4% de los casos, así como receptores androgénicos en 65.7% de los casos (Zhuofu Liu et al., 2015; Saylam, Yücel, Sungur, & Önerci, 2006). En 1973 Girgis realiza un estudio histopatológico encontrando pequeños acúmulos celulares de tipo Zellballen similares a las encontradas en los paragangliomas, por lo que lo consideraba un crecimiento paragangliónico anómalo propiciado por un desorden hormonal. Incluso sugieren el término de “Glomus nasofaríngeo” (Girgis & Fahmy, 1973). Por otra parte existe la teoría del atavismo vascular que menciona que el componente vascular del ANJ puede ser explicado por una regresión incompleta de la arteria del primer arco branquial, apoyando las características principales del tumor como el origen en la porción posterior de la cavidad nasal cerca del foramen esfenopalatino, su irrigación principal proveniente de la arteria maxilar; situando nuevamente al ANJ como una malformación vascular (Schick, Plinkert, & Prescher, 2002).

2.1.2 Histopatología

El ANJ es considerado un tumor benigno localmente agresivo, el cual raramente puede presentar transformación maligna a fibrosarcoma (Makek, Andrews, & Fisch, 1989). La regresión espontánea ha sido reportada adecuadamente para muy pocos casos de ANJ, por lo que se considera extremadamente rara. Debido a la falta de evidencia tangible algunos autores han negado rotundamente que pueda ocurrir (Dohar & Duvall, 1992; Gemmete, Ansari, McHugh, & Gandhi, 2009; Weprin & Siemers, 1991). Histológicamente el ANJ contiene dos componentes principales: un componente de células estrelladas dentro de una matriz de colágeno y un conglomerado complejo de vasos sanguíneos que varían en tamaño. Característicamente estos vasos sanguíneos carecen de láminas y fibras elásticas y el grosor de sus paredes es variable lo que le predispone a sangrar fácilmente (Blount et al., 2011).

2.1.3 Clasificación

Se han propuesto múltiples clasificaciones para el ANJ; la clasificación más usada es la de Andrews, Chandler y Radkowski la cual es de las más sencillas y se basa en la extensión tumoral (Snyderman & Pant, 2016). Una clasificación propuesta por Snyderman y Col. considera además de la extensión tumoral la vascularidad residual posterior a la embolización, por lo que se considera pronóstica en cuanto a la pérdida sanguínea, necesidad de múltiples intervenciones quirúrgicas y recurrencia (Snyderman & Pant, 2016).

En años más recientes Zixiang Yi y Col. presentan una nueva clasificación basada en una revisión de 51 casos en la cual dividen al ANJ en 3 tipos y proponen un abordaje quirúrgico distinto según cada estadio: tipo 1 se refiere a un tumor localizado en cavidad nasal, nasofaringe, senos paranasales, fosa pterigomaxilar, con extensión mínima a la fosa infratemporal, órbita o fosa craneal. Tipo 2 se encuentra localizado en fosa infratemporal, mejilla con extensión mínima a la fosa craneal anterior o extensión mínima a la fosa craneal media, y el tipo 3 se extiende de forma importante desde la fosa pterigomaxilar y fisura orbitaria dentro de la fosa craneal media (Yi et al., 2013).

2.1.4 Manifestación clínica

A pesar de que el ANJ es histológicamente benigno, tiene un comportamiento agresivo y una alta morbilidad por su patrón de crecimiento destructivo y la mortalidad pre- y perioperatoria generada por la hemorragia (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011).

Se considera que el ANJ se origina en la nasofaringe lateral, desde donde se puede propagar su crecimiento hacia la cavidad nasal, la orofaringe, los senos paranasales, la órbita y la fosa infratemporal (Snyderman, Pant, 2016), y en casos avanzados puede invadir la base del cráneo hasta en un 20%. Un 4.3% a 11% puede presentar invasión intracraneal, aunque es infrecuente que se presente la invasión intradural franca (Huang et al., 2013).

Los síntomas de la enfermedad están en función de la localización, el tamaño y la extensión tumoral (Bernal-sprekelsen, 2007). Los síntomas más comunes son obstrucción nasal unilateral en 91% de los casos y epistaxis en 63% de los pacientes (Blount et al., 2011). Y generalmente están presentes 6 a 7 meses previos al diagnóstico (Fatih Garca et al., 2010). Otros síntomas que pueden presentarse son cefalea en un 25%, edema facial en 10 a 18% de los casos, rinorrea unilateral, anosmia, hiposmia, rinolalia, hipoacusia conductiva, otalgia, edema del paladar, deformidad de la mejilla, diplopía y dolor ocular (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011). A la exploración física podemos encontrar

una masa nasal de carácter gris-rojizo de superficie lobulada y de tamaño variable hasta en 80% de los casos. Dependiendo de la extensión tumoral puede haber proptosis en un 10-15% y disminución de la agudeza visual (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011).

Se pueden presentar complicaciones originadas por el tumor o por las medidas terapéuticas empleadas. Puede ocurrir sangrado incontrolable que requiera de hemotransfusiones y/o taponamientos nasales previos o durante la cirugía (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011). Puede haber complicaciones secundarias a la embolización tales como isquemia, hemorragia, edema peritumoral accidentes cerebrovasculares, reacciones alérgicas al material de contraste e incluso la muerte (Patel, Hieb, & Kelly, 2014).

2.2 Receptores tipo Toll y virus.

Los receptores tipo Toll (TLR) se identificaron por primera vez en el embrión en desarrollo de *Drosophila*, en dónde se determinó su papel como un receptor esencial en el patrón dorso-ventral, y en el adulto por su papel en la respuesta antifúngica (Takeda & Akira, 2018). Los TLR son homólogos, en mamíferos, de los receptores Toll. El primer TLR en ser descubierto fue el TLR4, previamente nombrado como hToll por Medzhitov en 1997 ((Medzhitov & Janeway, 1997). Medzhitov describió a hToll como una proteína transmembranal con un dominio extracelular consistente en repeticiones ricas en leucinas (LRR), y un dominio citoplásmico homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina (IL)-1 (**Figura 1**).



Figura 1. Esquema de los dominios de un TLR. Inicia con el dominio extracelular de repeticiones ricas en leucina (LRR), el dominio transmembranal TM y un dominio intracelular homólogo al dominio citoplásmico del receptor de interleucina (IL)-1. Fuente: Kang & Lee, 2011.

Los TLR son un componente crucial en la respuesta a patógenos, específicamente por la capacidad de detectar moléculas características de estos patógenos, los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, por sus siglas en inglés), la interacción entre los TLR y sus respectivos PAMP desencadena una cascada de señalización intracelular que concluye en la alteración de la expresión génica, como la activación de la expresión de moléculas coestimuladoras y mediadores inflamatorios (citocinas y quimiocinas) (Pandey, Kawai, & Akira, 2015; Xagorari & Chlichlia, 2008). La familia de TLRs contiene actualmente 10 miembros en humanos (TLR1 a TLR10) y 12 miembros (TLR1 a TLR9, TLR11 a TLR13) en ratón (**Tabla 1**).

Tabla 1. Expresión de Receptores Tipo Toll (TLR), localización y ligandos en patógenos.

TLR	Especie	Localización	Ligandos en patógenos
TLR1	Humano y ratón	Membrana plasmática	Triacil lipopéptidos
TLR2	Humano y ratón	Membrana plasmática	Lipoproteínas, zimosano, manano, peptidoglucano, ácido lipoteicoico
TLR3	Humano y ratón	Membrana endolisosomal	ARN viral de doble cadena
TLR4	Humano y ratón	Membrana plasmática y endolisosomal	Lipopolisacárido
TLR5	Humano y ratón	Membrana plasmática	Flagelina
TLR6	Humano y ratón	Membrana plasmática	Diacil lipopéptidos, ácido lipoteicoico, zimosano
TLR7	Humano y ratón	Membrana endolisosomal	ARN viral y bacteriano de cadena sencilla
TLR8	Humano y ratón	Membrana endolisosomal	ARN viral y bacteriano de cadena sencilla
TLR9	Humano y ratón	Membrana endolisosomal	Regiones CpG del DNA viral y bacteriano, híbridos de DNA:RNA
TLR10	Humano	Membrana plasmática	Desconocido
TLR11	Ratón	Membrana endolisosomal	Profilina y flagelina
TLR12	Ratón	Membrana endolisosomal	Profilina
TLR13	Ratón	Membrana endolisosomal	ARN ribosomal bacteriano 23S

Fuente: De Nardo, 2015

Los receptores tipo toll, por su capacidad innata de reconocimiento de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas, son capaces de reconocer proteínas de la cápside, ADN y ARN viral, interacción que desencadena cascadas de señalización que resultan en producción de interferones, citocinas inflamatorias y quimiocinas por parte de la célula como defensa y para la eliminación de los virus (Xagorari & Chlichlia, 2008).

En 2011 el estudio de I. Daud, se encontró que el incremento de la expresión de TLR 3, 7, 8 y 9 es característico de la eliminación de la infección viral por VPH en mujeres jóvenes (Daud et al., 2011). De igual manera, la activación del TLR 7 mediante el fármaco antagonista imiquimod para la secreción de interferón- α , interleucina-6 (IL-6) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en pacientes con lesiones valvulares produce disminución del tamaño de la lesión, mejora en sintomatología y eliminación del VPH (Gildener-Leapman, Lee, & Ferris, 2014).

2.3 VPH y su relación con los tumores de cabeza y cuello

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de ADN de doble cadena que es común en la población general, su incidencia varía según el género y la edad (Best, Niparko, & Pai, 2012). La prevalencia reportada en las mujeres es del 26.8%, incrementándose hasta 44.8% en mujeres entre los 20 y 24 años. La prevalencia de este virus en la cavidad oral es de 10% en hombres y 6.9% en mujeres (Best et al., 2012).

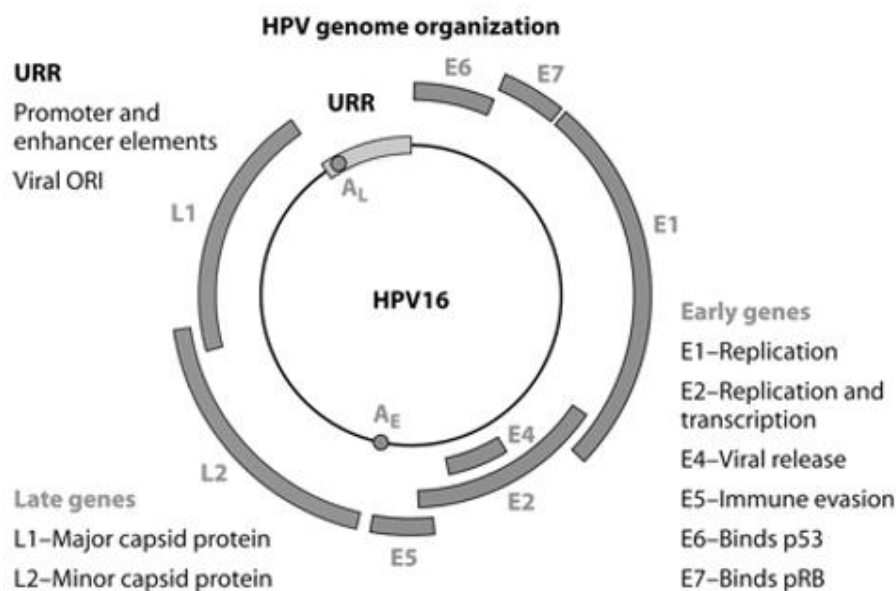


Figura 2. Representación esquemática de la organización del genoma de ADN circular del VPH.

Fuente: Stanley, 2012.

El VPH es capaz de alterar el ciclo celular mediante el empleo de oncoproteínas virales, principalmente la oncoproteína E7, la cual es capaz de formar un complejo con retinoblastoma (pRb) (Münger et al., 1989). El complejo E7/Rb es degradado mediante ubiquitinación por el proteasoma. Sin pRb como inhibidor del factor de transcripción E2F, E2F promueve la expresión de genes

necesarios para entrar en la fase S, con lo que se inicia la replicación celular de manera descontrolada. En este estado de descontrol de pRb se ha observado incremento en la expresión p16^{INK4a} (Reinstein, Scheffner, Oren, Ciechanover, & Schwartz, 2000; Reuschenbach et al., 2008).

La mayoría de las infecciones por el VPH son eliminadas por el sistema inmune en los primeros 2 años; el 66% a los 12 meses, incrementando al 90% a los 24 meses de la infección inicial. Sin embargo, en varones el VPH 16 se ha identificado como uno de los subtipos más lentos de eliminar; requiriendo hasta dos veces más tiempo que otros subtipos del virus. La incidencia de VPH 16 es de más del 90% en los cánceres de orofaringe en Estados Unidos (Best et al., 2012) y hasta en 90% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) (Vojtechova et al., 2016).

El CECC es la neoplasia maligna más común de cabeza y cuello y puede presentarse en cavidad oral, faringe, laringe o senos paranasales y a pesar de que el CECC está relacionado con el consumo de tabaco y alcohol, la incidencia de CECC relacionado al VPH está incrementando a nivel mundial (Udager & McHugh, 2017). En CECC el VPH 16 es el subtipo que se asocia hasta en un 85% a 90% de los casos en los que no existe ingesta de tabaco y alcohol (Ahmed, Mustafa, Eltom, & Babiker, 2012). Otros subtipos que se han relacionado son el VPH 18, 33 y 52 (Vojtechova et al., 2016).

Uno de los CECC en los que se ha observado la prevalencia de virus oncogénicos es el carcinoma nasofaríngeo, el cual es la neoplasia maligna más común de la nasofaringe, mayormente relacionada con el Virus del Epstein Bar (VEB), sin embargo, en países donde el VEB no es endémico una cantidad importante de carcinomas nasofaríngeos VEB negativo están asociados a VPH (Udager & McHugh, 2017). Otra neoplasia también relacionada con este virus es el carcinoma de tipo adenoideo quístico, que es un tumor recientemente descrito el cual se encuentra únicamente en la cavidad nasal y se asocia al VPH 33 (Udager & McHugh, 2017).

Otro tumor que se presenta en la cavidad nasal es el papiloma Nasosinusal Schneideriano, un tumor epitelial benigno de los senos paranasales también relacionado con el VPH, en mayor medida con subtipos de bajo riesgo tales como el VPH 6 y 11; las variedades de este tumor con displasia se asocian a serotipos de alto riesgo (Udager & McHugh, 2017).

Dado el hecho de que la infección persistente por VPH es un factor de riesgo conocido para el desarrollo de cánceres de orofaringe (Best et al., 2012); y que este patógeno es conocido por su efecto tumorigénico y asociación con una gran variedad de patologías neoplásicas, tales como el carcinoma

laríngeo, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma laríngeo, papiloma nasosinusal invertido y papilomatosis laríngea (Udager & McHugh, 2017), se ha comenzado a estudiar la relación de este virus con el ANJ.

Renkonen y col. analizaron la presencia de los TLR 3, 7 y 9 en muestras de tejido de ANJ, demostrando su presencia en la mayoría de las muestras estudiadas. Estos receptores, son una parte vital en la iniciación del mecanismo de inflamación y respuesta inmune innata; y son expresados por células del sistema inmune, epiteliales y endoteliales. Actuando como primera línea de defensa ante microbios. Por esto, se sugiere la posibilidad de un agente viral desencadenante de un proceso inflamatorio crónico subyacente implicado en el ANJ (Renkonen, Cardell, Mattila, & Lundberg, 2015). Mishra y col. encontraron la presencia de VPH en 100% de las muestras de tejido de ANJ de una corte de 6 casos, sugiriendo a este microorganismo como un posible factor etiológico o agravante de la enfermedad. Sin embargo, a nivel mundial se carece de literatura al respecto (A. Mishra et al., 2016).

2.4 VEB y su relación con los tumores de cabeza y cuello

El Virus de Epstein-Barr (VEB) es uno de los virus más extensamente distribuidos mundialmente; infecta a más del 90% de los adultos a nivel global (Maeda et al., 2009). Una vez infectado por VEB el sistema inmune es capaz de controlar la infección primaria, pero la infección persiste debido a la capacidad del virus de permanecer dentro las células B de memoria. De esta manera el virus se mantiene en el organismo durante la vida del huésped, en una infección asintomática que resulta en ningún daño hacia el huésped (Kutok & Wang, 2006).

El descubrimiento de VEB se realizó mediante su aislamiento a partir de una célula tumoral de Linfoma de Burkitt (LB). En 1961 Denis Burkitt, cirujano británico, describió este linfoma mientras trabajaba en África. Burkitt sospechaba de un agente infeccioso como el causal del padecimiento, pero fue incapaz de identificarlo (Burkitt, 1961, 1962a, 1962b; Burkitt & Wright, 1966). Perteneció a la familia de los herpesvirus, posee un genoma de ADN doble cadena de 184 kilopares de bases que codifican más de 85 genes, algunos de ellos reconocidos como oncogenes (**Figura 3**) (Young & Rickinson, 2004).

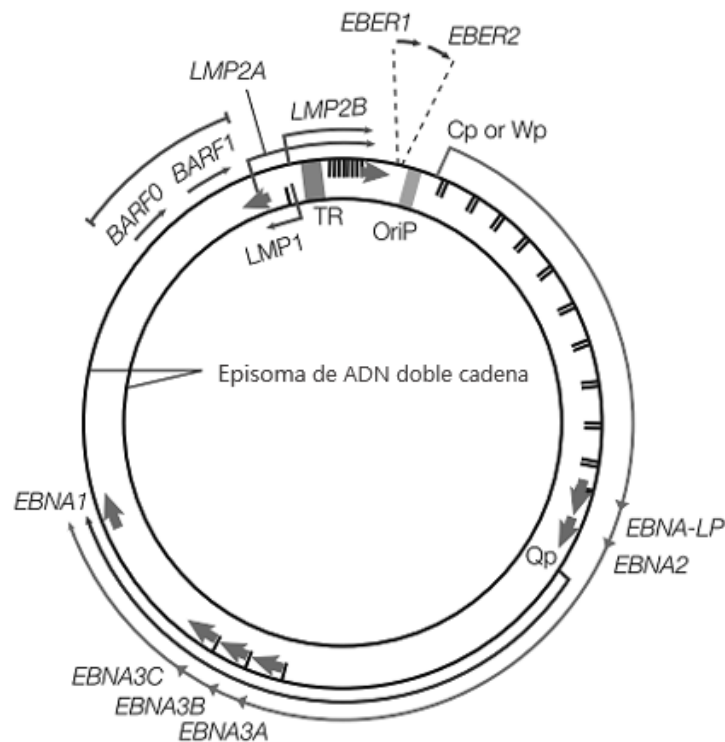


Figura 3. Organización del genoma del VEB en episoma de ADN de doble cadena. Modificado de: Young & Rickinson, 2004.

El grupo investigación que logró la identificación del VEB estaba encabezado por Anthony Epstein, en 1964. Mediante microscopía electrónica identificaron partículas de herpesvirus presentes en el cultivo de células de linfoma provenientes de pacientes con linfoma de Burkitt (Epstein, Achong, & Barr, 1964; Epstein & Barr, 1964). Esto marcó el primer lazo en la relación VEB y cáncer. Posteriormente se encontró VEB presente en muestras tejidos de pacientes con carcinoma nasofaríngeo, en linfoma de células T y linfoma de Hodgkin (Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, 1988; Weiss, Strickler, Warnke, Purtilo, & Sklar, 1987; zur Hausen et al., 1970).

En 2008 Román y colaboradores analizaron 15 muestras de ANJ embebidas en parafina y fijadas en formalina (FFPE, por sus siglas en inglés) en busca de genoma de VEB y Herpes Virus Humano-8 (HHV-8). Encontraron que ANJ no presenta asociación con VEB y HHV-8 (Román et al., 2008).

VEB contiene entre sus oncoproteínas virales a la proteína de membrana latente 1 (LMP1). LMP1 lleva a la alteración de las características morfológicas, resistencia a la inhibición de crecimiento por contacto y transformación tumorigénica en células de ratón transformadas para expresar LMP1

(Wang, Liebowitz, & Kieff, 1985). LMP1 actúa inhibiendo la actividad transcripcional de Ets2 en el promotor de p16^{INK4a}, al promover su translocación del núcleo hacia el citoplasma mediante la exportina 1, lo que reduce la expresión de p16^{INK4a} (Ohtani et al., 2003). p16^{INK4a} es una proteína importante en la regulación del ciclo celular mediante la vía de p16^{INK4a}-Retinoblastoma, ya que es un inactivador de la quinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) (Serrano, 1997). Cuando los niveles de p16^{INK4a} son bajos, CDK4/D1 se mantiene activa y fosforila a pRb, en su forma activada (pRb-P) se libera del factor de transcripción E2F y permite que realice su actividad, lo que inicia el paso de fase G1 a fase S en el ciclo celular (Romagosa et al., 2011).

Otro mecanismo de inactivación de p16^{INK4a} es la hipermetilación de las islas CpG en el promotor del gen. Los tumores de cabeza y cuello son el noveno tipo de cáncer con mayor porcentaje de hipermetilación de islas CpG, mientras que p16^{INK4a} es el gen supresor de tumor con mayor porcentaje de hipermetilación en cáncer humano (Esteller, 2002). En cáncer cervical, Kim y colaboradores, encontraron p16^{INK4a} metilado en el 60.5% de los tejidos positivos a infección por VEB (Na, Lin, Kyong, Hyun, & Kim, 2005).

3. JUSTIFICACIÓN

El ANJ es un tumor nasofaríngeo benigno altamente vascularizado de presentación casi exclusiva en adolescentes, con un comportamiento localmente agresivo y de alta morbilidad y mortalidad perioperatoria. Su etiología hasta el momento es incierta, sin embargo, existen múltiples teorías respecto a su génesis. Tanto el VPH como el VEB son comunes en la población general y son importantemente asociados a diversas neoplasias de cabeza y cuello, tales como el carcinoma de orofaringe, carcinoma de nasofaringe, o el carcinoma laríngeo. Recientemente se ha relacionado al VPH con el ANJ, no obstante, hasta el momento la literatura publicada es escasa. Renkonen y col. (Renkonen et al., 2015) reportaron una correlación entre la expresión de los TLR 3, 7 y 9 y el estado clínico de ANJ, por lo que sugieren la posibilidad de un agente viral desencadenante de un proceso inflamatorio. Mishra y col. (2016) encontraron la presencia de VPH en el 100% de sus muestras en un estudio con 6 casos de ANJ, sugiriendo a este virus como un posible factor etiológico o agravante de la enfermedad. Sin embargo, éste corresponde al único reporte en la literatura científica que asocia al VPH con el ANJ y los reportes acerca de la participación del VEB son aún controversiales.

4. HIPÓTESIS

Existe una correlación entre la infección por ciertos genotipos del VPH y VEB con los niveles de expresión de las proteínas de supresión tumoral p16^{INK4a} y pRb, y el historial clínico-epidemiológico de pacientes con ANJ.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la prevalencia y los genotipos del VPH, infección por VEB, así como la expresión de p16^{INK4a} y pRb en ANJ y su correlación con la historia clínica y el diagnóstico histopatológico.

5.2 Objetivos particulares

- 5.2.1** Determinar la prevalencia de la infección por VPH e identificar los genotipos de alto y bajo riesgo presentes en las muestras de ANJ.
- 5.2.2** Identificar la prevalencia de la infección por VEB en muestras de ANJ.
- 5.2.3** Evaluar los niveles de expresión de las proteínas de supresión tumoral p16^{INK4a} y pRb en muestras de ANJ.
- 5.2.4** Determinar una posible correlación entre la infección por los virus oncogénicos VPH y VEB con los niveles de expresión de las proteínas de supresión tumoral p16^{INK4a} y pRb y los datos clínico-epidemiológicos de pacientes con ANJ de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño del estudio.

Transversal, observacional, descriptivo y retrospectivo con autorización por las comisiones de Ética en Investigación y de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS (R-2018-785-018). El consentimiento informado no fue requerido debido a que se emplearon especímenes del banco de tumores. Los datos clínico-epidemiológicos de los pacientes fueron recabados por indagatoria en sus expedientes médicos, garantizando la confidencialidad y el resguardo apropiado de toda la información obtenida.

6.2 Conjunción del grupo de estudio.

Se incluyeron especímenes fijados en formalina y embebidos en parafina (FFyEP) de tejido nasofaríngeo de pacientes con diagnóstico de ANJ del Departamento de Otorrinolaringología y Anatomía Patológica de la Unidad Médica de Alta Especialidad No. 25 (UMAE 25) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) en Monterrey N.L. Todas las muestras fueron obtenidas y procesadas del 1 de enero del 2012 al 31 de diciembre del 2017. Se descartaron muestras con necrosis extensa (>50% de tejido necrótico), muestras con inadecuado procesamiento histológico y muestras de pacientes con expediente clínico no disponible. Como grupo control, se incluyeron especímenes de glándulas adenoides FFyEP del banco de tumores que fueron extirpadas a pacientes por condiciones distintas a ANJ.

6.3 Extracción de ADN.

Mediante punción con sacabocados de la zona del tumor de cada espécimen se obtuvieron de 1 a 3 cilindros de muestra de 2 mm de diámetro para la extracción de ADN empleando el *Nucleo Spin FFPE ADN* (Macherey–Nagel, Düren, Alemania). De acuerdo a las instrucciones del fabricante, el procedimiento inició con un proceso de desparafinización con solución disolvente e incubación a 60° C por 3 min, seguido del proceso de lisis celular con proteinasa K e incubación de al menos 3 horas. Posteriormente, se utilizaron columnas de afinidad para la purificación del ADN realizando un par de lavados para finalizar con la elución del producto. La concentración y pureza del ADN obtenido de cada muestra fue estimada mediante lecturas espectrofotométricas a 260 y 280 nm, así como la relación A260/A280 y A260/A230 en NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). Todas las muestras de ADN se almacenaron a -20 °C.

6.4 Detección y genotipificación del VPH.

La detección y genotipificación del VPH en cada espécimen evaluado fue realizada mediante el *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II* (Innogenetics, Bélgica), que se basa en el empleo de cebadores consenso (SPF10) para amplificar un fragmento de 65 pb de la región conservada L1 que posteriormente es hibridado en tiras con sondas y permite la identificación de 32 genotipos del virus. El ensayo contiene, además, controles de amplificación internos para monitorear la calidad de la muestra y la eficiencia de la extracción de material genético. El protocolo constó de tres etapas que a continuación son descritas.

6.4.1 Amplificación.

La amplificación de la región L1 del VPH se realizó por medio de una reacción de PCR empleando los cebadores biotinilados y la enzima ADN polimerasa *AmpliTaq Gold 360* que son proporcionados en los reactivos *AMP MIX* y *ENX MIX*. Las reacciones se realizaron de forma independiente con 37.7 µL de *AMP MIX*, 2.3 µL de *ENX MIX* y 10 µL de muestra de ADN. Las condiciones de amplificación se especifican en la **Tabla 2**. Para cada ensayo de PCR se incluyeron dos reacciones como controles, una para amplificación de un fragmento del gen HLA-DPB1 a partir de ADN humano (ADNh) como validación de la calidad de la extracción de ADN y otra para amplificación del VPH-6 como control positivo.

Tabla 2. Condiciones de amplificación por PCR de la región L1 del VPH empleando los cebadores SPF10 del *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Kit II* (Innogenetics, Bélgica).

Paso	Reacción	Temperatura	Tiempo
1	Activación y descontaminación	37° C	10 min
2	Desnaturalización general	94° C	9 min
3	Desnaturalización	94° C	30 seg
4	Alineamiento	72° C	45 seg
5	Extensión	72° C	45 seg
6	Repetir 40 veces desde el paso No. 3	-	-
7	Extensión final	72° C	2h

6.4.2 Hibridación y revelado.

La hibridación inició con un paso de desnaturalización mediante incubación de 10 µL del producto amplificado con 10 µL de solución desnaturalizante (*Denaturation solution*) a temperatura ambiente por 5 min en canaletas plásticas individuales para cada muestra. A continuación, se añadieron 2 mL de la solución de hibridación precalentada a 37° C (*Hybridization solution*) e inmediatamente se colocó la tira para hibridación en cada canaleta con una incubación a 49° C en baño maría durante 60 min y agitación constante (80 rpm). Posteriormente, se retiró por aspiración todo el líquido de cada una de las canaletas y se le añadieron 2 mL de solución de lavado precalentada (*Stringent Wash Solution*) a 37° C. El procedimiento de lavado se realizó tres veces y en cada repetición de enjuague se aplicó agitación durante 20 seg a temperatura ambiente. Para terminar, se añadieron 2 mL de la solución de lavado a cada canaleta con su tirilla y se incubó a 49° C en baño maría durante 30 min con agitación constante (80 rpm).

Para iniciar el procedimiento de revelado, se realizaron dos lavados de las tirillas en las canaletas con 2 mL de la solución de enjuague diluida (*Rinse Solution*) durante 1 min. El revelado procedió con una incubación de cada una de las tirillas con 2 mL de solución conjugado (*Conjugate Solution*) en agitación por 30 min a temperatura ambiente, posteriormente se retiró el líquido y se realizaron dos lavados con 2 mL de solución de enjuague diluida (*Rinse Solution*) durante 1 min y un lavado con 2 mL de solución amortiguadora de sustrato (*Substrate Buffer*). Posteriormente, se añadieron 2 mL de solución sustrato (*Substrate Solution*) a cada canaleta y se incubaron a temperatura ambiente por 30 min en agitación constante. Para finalizar el revelado, se retiró el líquido remanente de cada canaleta y se realizarán varios lavados con 2 mL de agua ultra pura (Milli-Q) en agitación por alrededor de 3 min, se retiró el exceso de agua y se dejaron secar durante 1 h a temperatura ambiente.

6.4.3 Interpretación de resultados.

La interpretación de los resultados en las tirillas fue realizada con base en los criterios indicados en el *INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II* (**Tabla 3**). El primer paso consistió en la validación de los marcadores para los tres controles. La primera banda corresponde al control del conjugado y debe resultar siempre positiva; la segunda al amplicón de ADN_h que es incluido para monitorear la calidad de la extracción de ADN y debe resultar positiva a

menos de que existan grandes cantidades de ADN del VPH en la muestra; y las dos bandas siguientes que corresponden a la amplificación del VPH-6 y que pueden resultar positivas o negativas (**Figura 4**). Una vez validadas, las tirillas fueron analizadas siguiendo la guía para la verificación e identificación de genotipos de acuerdo con las bandas resultantes (**Tabla 4**).

Tabla 3. Criterios de interpretación de los ensayos de hibridación en tira (LiPA) del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Kit (Innogenetics, Bélgica).

VPH	ADNh	Interpretación
-	-	Resultado inválido Un resultado negativo en la línea de control ADNh indica una inadecuada colecta de la muestra, proceso de extracción no apropiado o presencia de inhibidores en la extracción de ADN
-	+	VPH no detectado Un resultado negativo en ambas líneas de control de VPH y líneas de genotipos indica la ausencia de ADN de VPH.
+	-	VPH detectado Un resultado positivo en al menos una de las líneas de genotipos o líneas de control de VPH indica la presencia de ADN de VPH.
+	+	VPH detectado Un resultado positivo en al menos una de las líneas de genotipos o líneas de control de VPH y además la línea de control ADNh indicó la presencia de ADN de VPH.

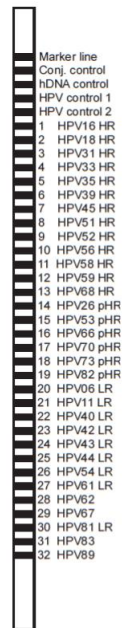


Figura 4. Localización de las sondas específicas en la tira del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II. La parte superior de la tira presenta una línea de marcado para la orientación.

Tabla 4. Guía para la identificación de genotipos del VPH en los ensayos de hibridación en tira (LiPA) del INNO-LiPA HPV Genotyping Extra II (Innogenetics, Bélgica).

	Genotipos de VPH																																		
Probe #	6 LR	11 LR	16 HR	18 HR	18 pHR	31 HR	33 HR	35 HR	39 HR	40 LR	43 LR	44 LR	45 HR	45 HR	51 HR	52 HR	53* pHR	53* pHR	54 LR	56 HR	58 HR	58 HR	58 HR	58 HR	59 HR	66* pHR	68 HR	69/71**	70 LR	70 LR	73 HR	74**	82 HR		
1	X																																		
2		X																																	
3			X																																
4				X																															
5					X																														
6						X																													
7																													X						
8						X				X										X			X	X											
9						X	X												X																
10						(X)**	X																												
11								X																											
12				X	X					X																		X				X			
13										X																									
14											X																								
15												X																							
16													X	X																					
17															X																				
18						X	X			X						X						X	X	X	X										
19																	X	X																	
20																				X														X	
21																																			
22																				X															
23																									X										
24																										X									
25													X														X				X	X			
26																														X	X				
27																																X			
28																																			X

HR: Genotipo de alto riesgo; LR: Genotipos de bajo riesgo.

6.5 Detección del VEB.

La detección de ADN del VEB fue realizada mediante reacciones independientes de qPCR (en tiempo real) empleando cebadores y sondas de hidrólisis diseñadas a partir de un ensayo publicado anteriormente (Ryan, 2004). Previo a las reacciones de amplificación, se prepararon diluciones para ajustar todas las muestras a 50 ng de ADN en un volumen final de 20 µL.

6.5.1 Diseño de ensayos.

Para la detección del VEB se diseñó un par de oligonucleótidos y sonda para la amplificación de una región del gen de la glicoproteína de membrana LMP2 (NCBI, GenBank – No. Acceso: V01555) con base un ensayo reportado por Ryan et al., 2004. Se eligió el par de cebadores con mejores características moleculares mediante la herramienta Primer3Plus (Untergasser et al, 2007) para amplificar un producto final de 69 pb (**Tabla 5**). Las soluciones de trabajo de los ensayos fueron preparadas en una relación 2:1 entre cebadores y sonda.

Tabla 5. Oligonucleótidos empleados para la amplificación de un fragmento de 69 pb de la región LMP2 del VEB.

Nombre	Secuencia del oligonucleótido	Posición	Tm (°C)
Oligo F	5'-AGC TGT AAC TGT GGT TTC CAT GAC-3'	679-702	57
Sonda	6FAM5'-CTG CTG CTA CTG GCT TTC GTC CTC TGG-3' TAMRA	704-731	64
Oligo R	5'-GCC CCC TGG CGA AGA G-3'	733-748	60

6.5.2 Preparación de las reacciones de amplificación.

Para la estandarización previa de las reacciones y ensayos de límites de detección, así como para control positivo de amplificación, se empleó un bloque de ADN sintético (gBlock Gene Fragment, IDT– Integrated DNA Technologies, California, E.U.A.) cuya secuencia incluía la región de amplificación de LMP2 del VEB (**Figura 5**). Se prepararon diluciones seriadas con el ADN sintético control (1E-1 a 1E-11) y se generó una curva de calibración para examinar de la eficiencia y los límites de detección utilizando el programa en línea SciencePrimer (Andrew Staroscik, 2011).

AGT	TTT	ACA	AGC	ACT	CCA	CCA	AAG	CTA	AAA	AAC	AGA	GAA	GAA	ACT	CCT	GTT	CCT	ACT
AAT	TTT	CCT	ATT	GAT	GTT	TCT	GAT	TAT	CTT	AGC	CAT	GCT	GTA	TAT	TTT	TTG	ACA	GCC
GCT	GCC	CAA	CAC	AAG	GTG	AAG	CCT	ACC	TTG	ACA	AGC	AGT	CAG	ACA	CTC	AAT	ATG	TCT
GCA	AAA	GAA	CGT	TAG	TGG	ACA	GAT	TTT	TCT	TGG	AGC	TGT	AAC	TGT	GGT	TTC	CAT	GAC
GCT	GCT	GCT	ACT	GGC	TTT	CGT	CCT	CTG	GCT	CTC	TTC	GCC	AGG	GGG	CCT	AGG		

Figura 5. Secuencia del bloque sintético de ADN diseñado para emplearse como control positivo de amplificación del VEB. En negritas y con resaltado gris se indica el amplicón del VEB.

Todas las reacciones fueron realizadas empleando el reactivo GoTaq Probe qPCR Master Mix (Promega, WI, E.U.A.) y siguiendo las instrucciones presentadas por el fabricante en el equipo termociclador Light Cycler (Roche) del Departamento de Biología Molecular, Genómica y Secuenciación (BMGyS) del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la UANL. El programa de amplificación inició con un paso previo de incubación a 50 °C por 2 min; la desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 60 ciclos de 95 °C por 10 seg, 55 °C por 5 seg y 60 °C por 1 min, para finalizar a 40 °C durante 5 min.

6.6 Evaluación de expresión de p16^{INK4a} y pRb.

La evaluación de la expresión de p16^{INK4a} y pRb fue realizada mediante tinciones inmunohistoquímicas con los anticuerpos Anti-CDKN2A/ p16^{INK4a} [EPR1473]-C-terminal (ab108349) y Anti-Rb recombinante [EPR17512] (ab181616) (Abcam, Cambridge, UK). Como control de la tinción inmunohistoquímica de p16^{INK4a} se empleó tumor de mama, mientras que para la inmunotinción de pRb se utilizó tejido tumoral de cérvix; ambos tejidos control fueron colocados próximos a la muestra problema en cada una de las laminillas.

6.6.1 Cortes y montaje.

Los bloques de tejidos FFyEP fueron llevados al Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario “Dr. José E. González” de la U.A.N.L. para la realización y colocado de cortes histológicos de 5 µm en portaobjetos recubiertos de 3-aminopropiltriethoxisilano (APTS).

6.6.2 Tinción con hematoxilina y eosina (HyE).

El protocolo de desparafinización comenzó colocando las laminillas en una cubeta de tinción con xilol durante 10 min, este paso se repitió en otra cubeta durante el mismo tiempo. A continuación, se realizó la rehidratación de las laminillas colocándose cada una durante 10

min en cubetas que contenían etanol absoluto, alcohol al 96%, alcohol al 80%, alcohol al 50% y 5 min en agua destilada. Para la tinción con hematoxilina se colocaron las laminillas en una cubeta con colorante durante 5 min y posteriormente se realizó un lavado con agua de 15 min y 2 lavados de 1 min con agua destilada. Después, para la tinción con eosina, las laminillas se dejaron reposando en una cubeta durante 2 min. Se continuó con el proceso de deshidratación para lo que se sumergió cada laminilla por 20 seg en cubetas que contenían alcohol al 70% y alcohol al 96%; posteriormente, se realizaron 2 lavados de 3 min cada uno en etanol absoluto y otros dos con xilol durante 10 min. El sellado se llevó a cabo colocando una gota de resina sobre el tejido y cubriéndolo con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

6.6.3 Tinción inmunohistoquímica de p16^{INK4a} y pRb.

Como preparación previa, se incubaron todas las laminillas a 60 °C durante 12-15 horas. El protocolo de desparafinización comenzó colocando las laminillas en una cubeta de tinción con xilol durante 5 min y este paso se repitió en otra cubeta con xilol durante el mismo tiempo. Posteriormente, se realizó la hidratación sumergiendo en diferentes cubetas durante 3 min cada laminilla con etanol absoluto, alcohol al 96%, alcohol al 80%, agua destilada y para finalizar en solución amortiguadora de fosfatos (PBS). A continuación, se realizó la recuperación antigénica empleando el equipo PT Link (DAKO, California, EUA), en el que se sumergieron todas las laminillas en solución amortiguadora de Tris-EDTA (pH 9) a 98 °C durante 20 min.

Para la realización de la inmunodetección se empleó el Mouse and Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC Kit (Abcam, Cambridge, UK). Las laminillas fueron recubiertas una por una con peróxido de hidrógeno e incubadas durante 5 min en una cámara de humedad y lavadas con PBS por 3 minutos. Posteriormente se recubrieron con solución bloqueadora de proteínas durante 5 minutos, lavados con PBS por 3 min y continuación, el tejido fue recubierto durante 30 min con el anticuerpo correspondiente. Para p16^{INK4a}, el anticuerpo fue preparado a una concentración de 1:100 y anti-Rb se preparó a una concentración final de 1:250. Seguido de esto, se realizó un lavado en solución PBS durante 3 minutos y se colocó el anticuerpo secundario biotinilado en las laminillas por 10 minutos para posteriormente realizar un lavado durante 3 minutos en PBS. Después, se añadió estreptavidina peroxidasa e incubó por 10 minutos y se realizó un lavado durante 3 minutos en PBS. Después se recubrió

durante 5 minutos con 3,3'-diaminobenzidina (DAB) que fue previamente preparado mezclando 30 µl de cromógeno DAB por cada mililitro de sustrato DAB. Finalmente, se realizó un lavado en agua y se añadió hematoxilina durante 45 seg para finalizar lavando con agua. Para el protocolo de deshidratación, las laminillas fueron sumergidas 10 veces en cada cubeta con alcohol al 80%, alcohol al 96% y etanol absoluto, posteriormente en xilol por duplicado. Finalmente, se realizó el sellado con resina colocando una gota de resina sobre el tejido y cubriéndolo con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas.

6.6.4 Interpretación de la expresión de p16^{INK4a} y pRb.

Cada laminilla teñida fue examinada en el microscopio óptico por dos médicos patólogos de forma independiente, quienes determinaron el porcentaje de células teñidas, así como la intensidad de la expresión de p16^{INK4a} y pRb en escala de +, ++, +++ y/o +++, que corresponden a 0-24, 25-49, 50-74 y 75-100% respectivamente.

6.7 Análisis estadístico.

Los resultados se muestran en frecuencias absolutas y porcentajes o medianas y rangos. Para el análisis estadístico se emplearon las pruebas de U de Mann-Whitney, X² de Pearson y la prueba exacta de Fisher. Se consideró como significativo un valor de $p < 0.05$. Todos los análisis fueron realizados en el programa IBM SPSS Statistics (Version 25, SPSS. Inc., Chicago, E.U.A.).

7. RESULTADOS

7.1 Población incluida en el estudio.

Un total de 24 especímenes FFyEP con diagnóstico de ANJ y con información clínica completa conformaron el estudio (**Tabla 6**). Todas los especímenes (100%) corresponden a pacientes del género masculino; la mayoría fueron tratados con embolización previa a la resección quirúrgica del tumor con un total de 14 (58.3%) pacientes. El estadio tumoral predominante, según la escala de Andrews (Herrero et al., 2015) fue el II con 12 (50%) de los pacientes, el segundo más común fue el estadio IIIA con 6 (25%) pacientes y posteriormente el estadio IIIB con 4 (16.7%) y el IVB con 2 (8.3%) de los pacientes.

Tabla 6. Información clínica de los 24 pacientes con ANJ.

Paciente	Edad IS ^a	Embolización	Estadio ^b	Sangrado ^c
01	20	NO	II	700
02	11	SI	IIIA	350
03	22	SI	IIIA	150
04	18	SI	II	200
05	19	NO	II	200
06	20	SI	II	600
07	13	SI	IVB	3000
08	19	SI	II	500
09	10	SI	II	700
10	28	NO	II	200
11	23	NO	II	50
12	13	SI	IIIA	1000
13	14	NO	IIIB	4500
14	13	SI	II	800
15	10	SI	IVB	500
16	17	NO	IIIA	1000
17	16	NO	II	500
18	22	NO	II	500
19	15	SI	IIIB	1200
20	16	SI	IIIA	3800
21	13	NO	II	150
22	13	SI	IIIB	1500
23	13	SI	IIIA	500
24	11	NO	IIIB/Recidiva	-

^aEdad al inicio de los síntomas

^bEscala de Andrews (Herrero et al., 2015)

^cVolumen en mililitros

El grupo control estuvo constituido por 6 especímenes de glándulas adenoides FFyEP que habían sido extirpadas a pacientes pediátricos por condiciones distintas a ANJ y que fueron obtenidos del banco de tumores (**Tabla 7**).

Tabla 7. Información clínica de 6 pacientes incluidos como casos control para la evaluación de la infección por VPH y VEB, y la expresión de p16^{INK4a} y pRb en ANJ.

Paciente	Sexo	Edad	Enfermedad de base	Indicación de adenoidectomía
01	F	9	Rinitis alérgica; apnea de sueño	Obstrucción de vía respiratoria
02	F	9	Apnea de sueño	Obstrucción de vía respiratoria
03	M	6	Apnea de sueño	Obstrucción de vía respiratoria
04	M	8	Apnea de sueño	Obstrucción de vía respiratoria
05	M	4	Rinitis alérgica	Obstrucción de vía respiratoria
06	F	7	Rinitis alérgica	Obstrucción de vía respiratoria

7.2 Aislamiento de ADN.

El aislamiento de ADN se realizó a partir de la punción con sacabocados de la zona tumoral de cada muestra, según las indicaciones del médico patólogo. Las concentraciones de DNA obtenidas oscilaron entre los 400 y los 50 ng/μL.

7.3 Detección y genotipificación del VPH.

La detección de muestras VPH positivas fue un total de 4 (16.7%) de las 24 de ANJ analizadas. De los cuatro especímenes con resultado positivo para VPH, dos de ellos (8.3%) corresponden a los genotipos de alto riesgo 58 y 82; mientras que los otros dos (8.3%) corresponden a los genotipos de bajo riesgo 6 y 11 (**Tabla 8**). Los cuatro especímenes positivos para VPH (100%) corresponden al grupo de edad de 14 a 25 años. En el caso de los casos controles, los 6 (100%) dieron negativo para la presencia de VPH (**Tabla 9**).

7.4 Estandarización del ensayo de qPCR para la detección del VEB.

La estandarización y validación de los límites de detección del ensayo de qPCR para la detección del VEB se realizó mediante diluciones seriadas ($1E^{-1}$ a $1E^{-11}$, a partir de una concentración de 10 ng/μL) para generar la curva de calibración (**Figura 6**) y la elaboración de gráficas de regresión según los puntos de CT (**Figura 7**). El cálculo del número exacto de copias como límite de detección fue de 1 copia de ADN por reacción.

Tabla 8. Infección por VPH y VEB en 24 pacientes con ANJ.

Paciente	Edad IS ^a	VPH	Genotipo	VEB
01	20	-	-	+
02	11	-	-	-
03	22	-	-	-
04	18	-	-	-
05	19	-	-	-
06	20	-	-	-
07	13	-	-	-
08	19	-	-	-
09	10	+	82 (pAR)	-
10	28	-	-	-
11	23	-	-	-
12	13	-	-	-
13	14	-	-	-
14	13	-	-	-
15	10	-	-	-
16	17	-	-	-
17	16	-	-	-
18	22	+	6	-
19	15	+	11	-
20	16	-	-	-
21	13	-	-	-
22	13	+	58 (AR)	-
23	13	-	-	-
24	11	-	-	-

^aEdad al inicio de los síntomas.

pAR, probable alto riesgo; AR, alto riesgo.

Tabla 9. Infección por VPH y VEB en glándulas adenoides de 6 pacientes pediátricos sin ANJ .

Paciente	VPH	VEB
01	-	-
02	-	+
03	-	+
04	-	+
05	-	+
06	-	-

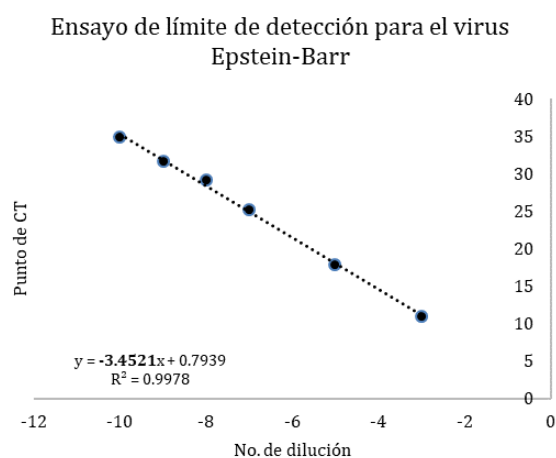


Figura 6. Curva de amplificación de las diluciones 1E-3, 1E-5, 1E-6, 1E-9 y 1E-11 del bloque sintético de ADN.

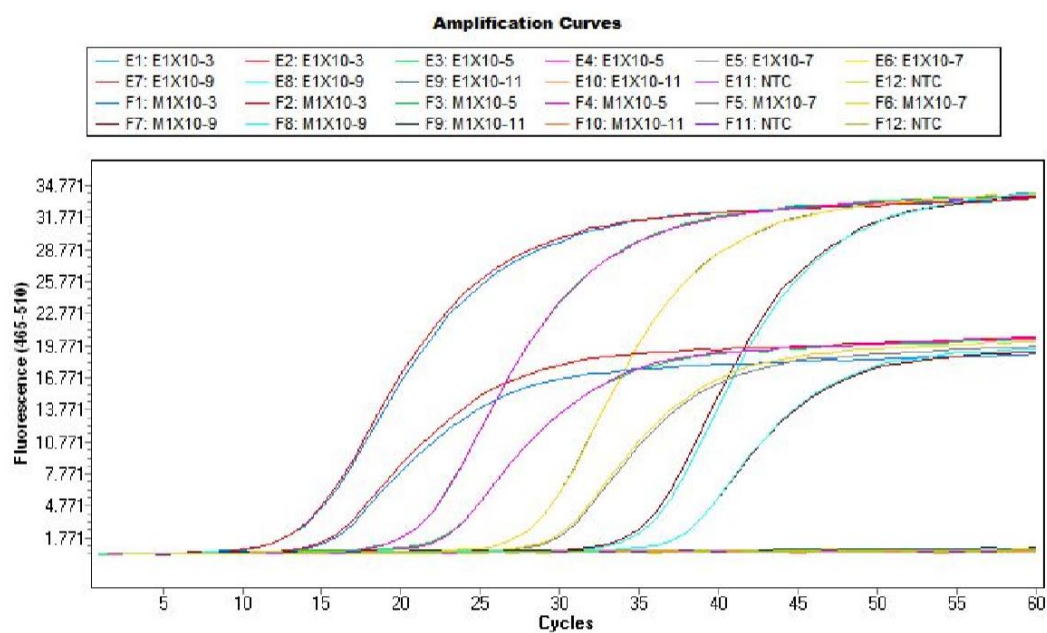


Figura 7. Gráfica de regresión para la determinación del límite de detección en los ensayos de diagnóstico. En la gráfica se muestra una eficiencia de reacción de 0.94 para el VEB.

7.5 Detección del VEB.

Luego de la estandarización se procedió a la detección del ADN viral en las muestras mediante reacciones independientes de qPCR. De los 24 casos analizados, 1 (5.9%) resultó positivo para la detección de ADN de VEB (**Tabla 8**). En el caso de las 6 muestras de adenoides, 4 (66.7 %) resultaron positivo para VEB (**Tabla 9**).

7.6 Análisis de la prevalencia del VPH, VPH-AR y VEB en ANJ con respecto a las características clínico-histopatológicas de los pacientes.

De los 24 casos de ANJ estudiados, 4 (16.7%) son positivos para la presencia del ADN del VPH, 2 (8.3%) positivos para VPH-AR y 1 (4.2%) positivo para VEB. No se observó diferencia significativa entre la edad y la presencia de los virus ($p=0.57$, $p=0.136$, $p=0.431$; respectivamente). En cuanto al grado del tumor, según el estadio de Andrews, 12 (50%) de los 24 casos presentaron estadio II, 2 (8.3%) de los cuales resultaron positivo para VPH, 1 (4.2%) positivo para VPH-AR y 1(4.2%) positivo para VEB. 6 (25%) de los 24 casos presentaron estadio IIIA. 4 (16.7%) de los 24 casos presentaron estadio IIIB, 2 (8.3%) de los cuales resultaron positivo para VPH, y 1 (4.2%) positivo para VPH-AR. 2 (8.3%) de los 24 casos presentaron estadio IVB. No se observó diferencia significativa entre estadio de Andrews y la presencia de los virus ($p=0.88$, $p=0.919$, $p=0.465$; respectivamente) (**Tabla 10**).

Tabla 10. Prevalencia de la infección por VPH y sus genotipos, así como del VEB, en 24 pacientes con ANJ y sus características clínicas.

	Total (n=24)	Virus del Papiloma Humano			Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo			Virus de Epstein-Barr		
		Positivo (n=4)	Negativo (n=20)	<i>p</i>	Positivo (n=2)	Negativo (n=22)	<i>p</i>	Positivo (n=1)	Negativo (n=23)	<i>p</i>
Edad (años)^a	15.5 [10-28]	14 [10-22]	16.5 [11-29]	0.57	11.5 [10-13]	17.5 [11-29]	0.136	20	17 [11-29]	0.431
Embolización				0.615			0.493			0.391
Si	14 58.3%	3 12.5%	11 45.8%		2 8.3%	12 50%		- -	14 58.3%	
No	10 41.7%	1 4.2%	9 37.5%		- -	10 41.7%		1 4.2%	9 37.5%	
Estadio de Andrews				0.88			0.919			0.465
I	- -	- -	- -		- -	- -		- -	- -	
II	12 50.0%	2 8.3%	10 41.7%		1 4.2%	11 45.8		1 4.2%	11 45.8%	
IIIA	6 25.0%	- -	6 25%		- -	6 25.0		- -	6 25%	
IIIB	4 16.7%	2 8.3%	2 8.3%		1 4.2%	3 12.5		- -	4 16.7%	
IVA	- -	- -	- -		- -	- -		- -	- -	
IVB	2 8.3%	- -	2 8.3%		- -	2 8.3%		- -	2 8.3%	

^aSe presenta la edad al inicio de los Síntomas [rango].

7.7 Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} y pRb en ANJ.

La valoración de las 24 laminillas con tinción por HyE e IHQ para pRb y 24 laminillas para p16 permitió la determinación de la expresión de pRb (>25% de tinción celular) y la expresión de p16 (>75% de tinción celular) así como la intensidad de su expresión en rangos de +, ++, +++, +++++ (0-24, 25-49, 50-74, 75-100%) (Tabla 11) (Figuras 8-15). En el caso de la expresión de p16^{INK4a}, las laminillas pertenecientes a los pacientes 3, 10 y 17 no pudieron ser determinadas. En el caso del paciente 18, la sección del tumor FFyEP presentaba extensa necrosis, lo que imposibilitó la evaluación de las tinciones por parte de los médicos patólogos.

Tabla 11. Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} y pRb en ANJ.

Paciente	Edad IS ^a	Expresión pRb	Intensidad pRb	Expresión p16 ^{INK4a}	Intensidad p16 ^{INK4a}
01	20	10%	-	80%	++
02	11	40%	-	60%	+
03	22	20%	-	ND ²	ND ²
04	18	10%	-	50%	++
05	19	10%	-	30%	++
06	20	No	-	50%	+++
07	13	No	-	50%	+++
08	19	No	-	70%	++
09	10	10%	-	20%	+
10	28	90%	++++	ND ²	ND ²
11	23	95%	++++	30%	++
12	13	90%	+++	50%	+
13	14	95%	++++	50%	++
14	13	95%	+++	30%	++
15	10	90%	+++	15%	++
16	17	95%	+++	30%	+
17	16	95%	+++	ND ²	ND ^b
18	22	Necrosis	Necrosis	Necrosis	Necrosis
19	15	90%	+++	80%	+++
20	16	95%	+++	70%	+++
21	13	50%	+++	70%	++
22	13	25%	++	20%	+
23	13	80%	+++	50%	++
24	11	90%	+++	40%	+++

^aEdad al inicio de los síntomas

^bNo determinado

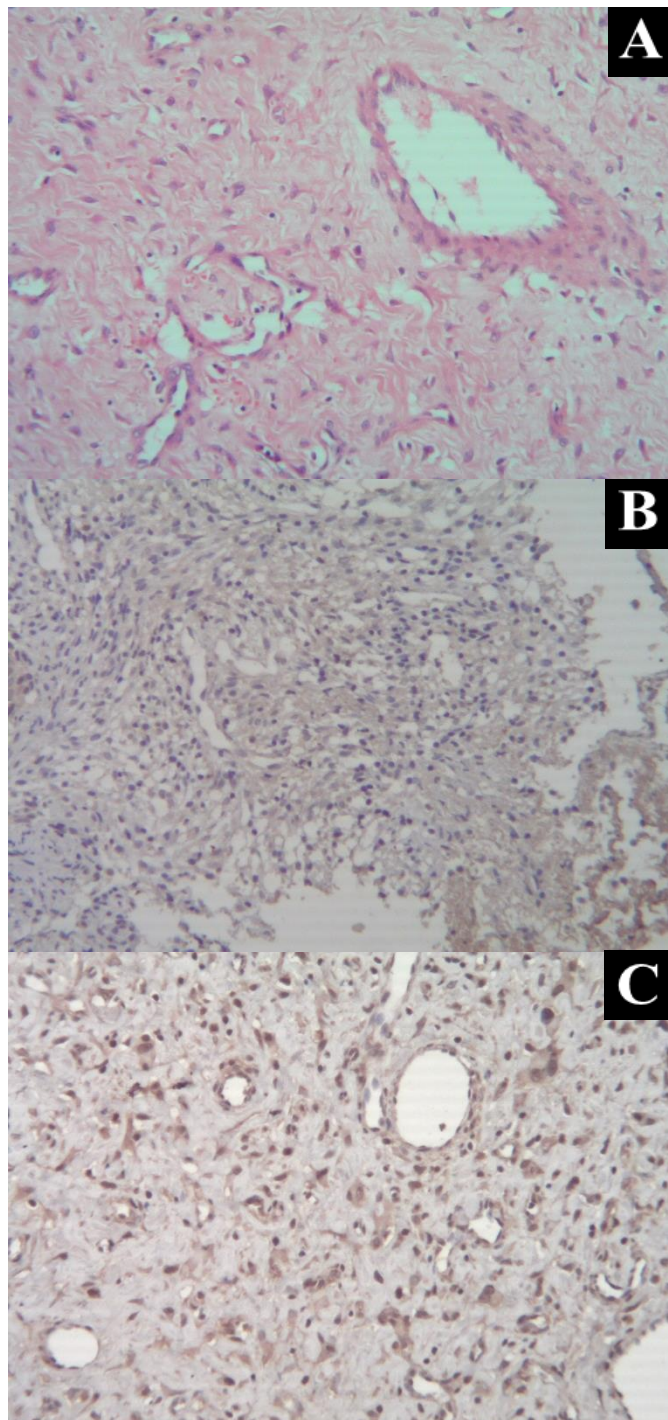


Figura 8. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en ANJ del paciente No. 11. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16^{INK4a} (++) por IHQ.

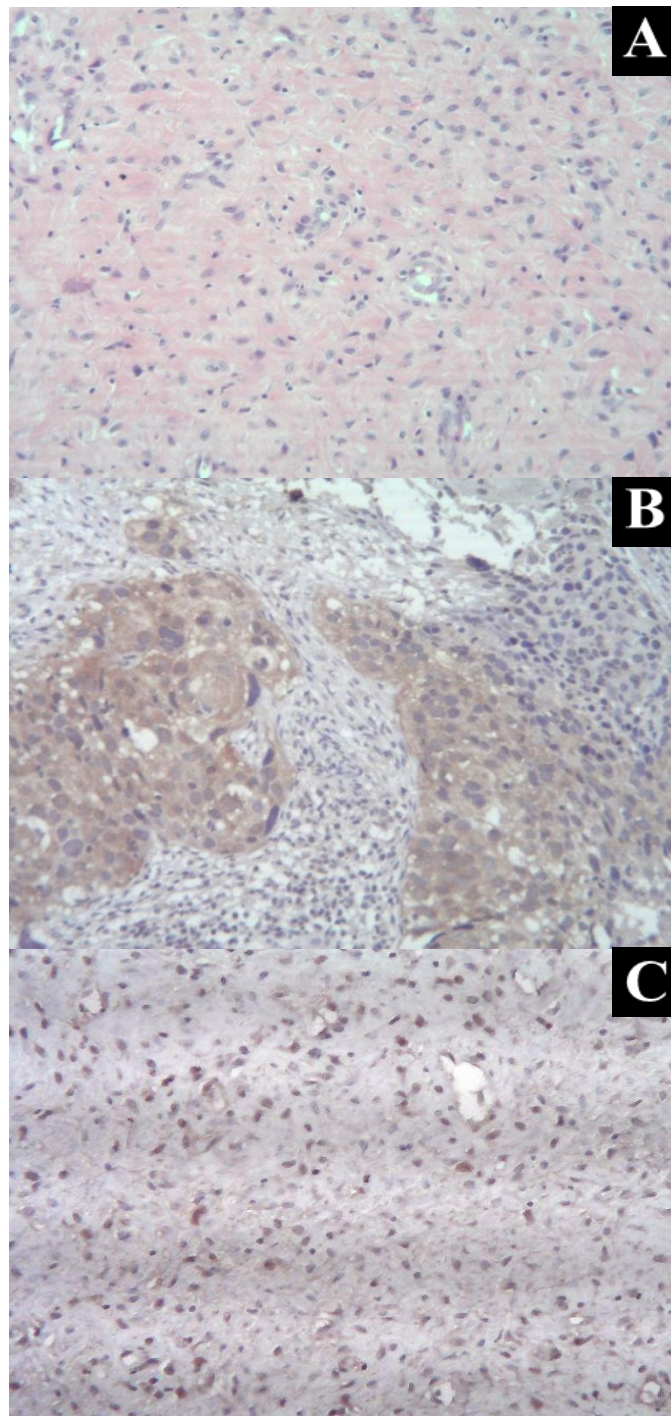


Figura 9. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en ANJ del paciente No. 12. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en carcinoma de cérvix C) Expresión nuclear de p16^{INK4a} (+) por IHQ.

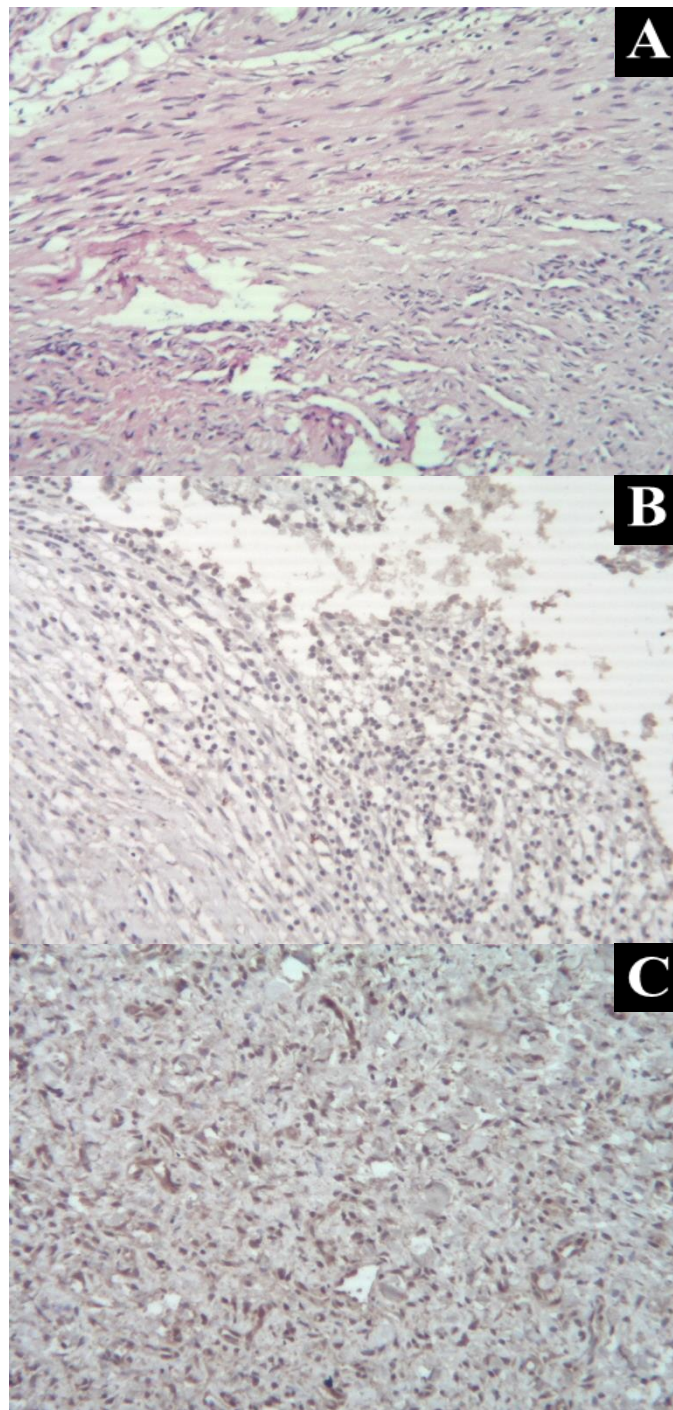


Figura 10. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en ANJ del paciente No. 16. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16^{INK4a} (+) por IHQ.

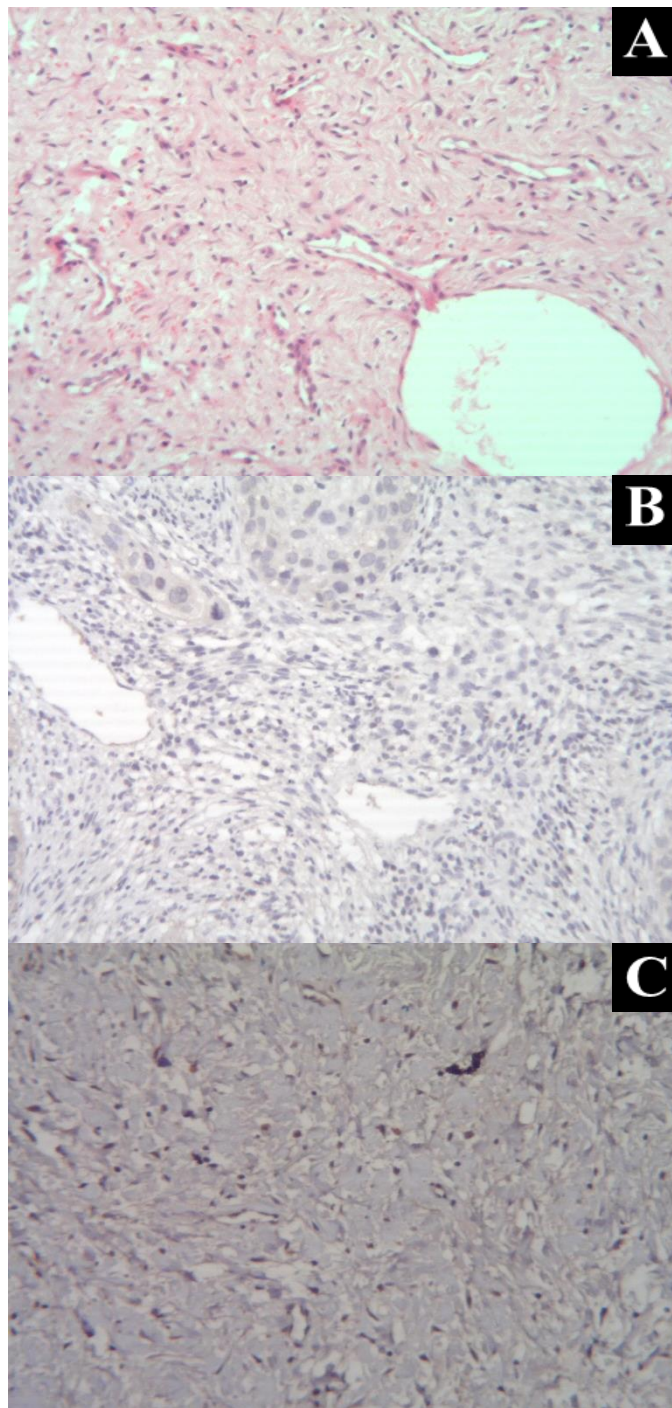


Figura 11. Tinción IHQ para p16^{INK4a} en ANJ del paciente No. 19. El tumor es positivo para VPH 11 y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de p16^{INK4a} por IHQ en carcinoma de cérvix. C) Expresión nuclear de p16^{INK4a} (+++) por IHQ.

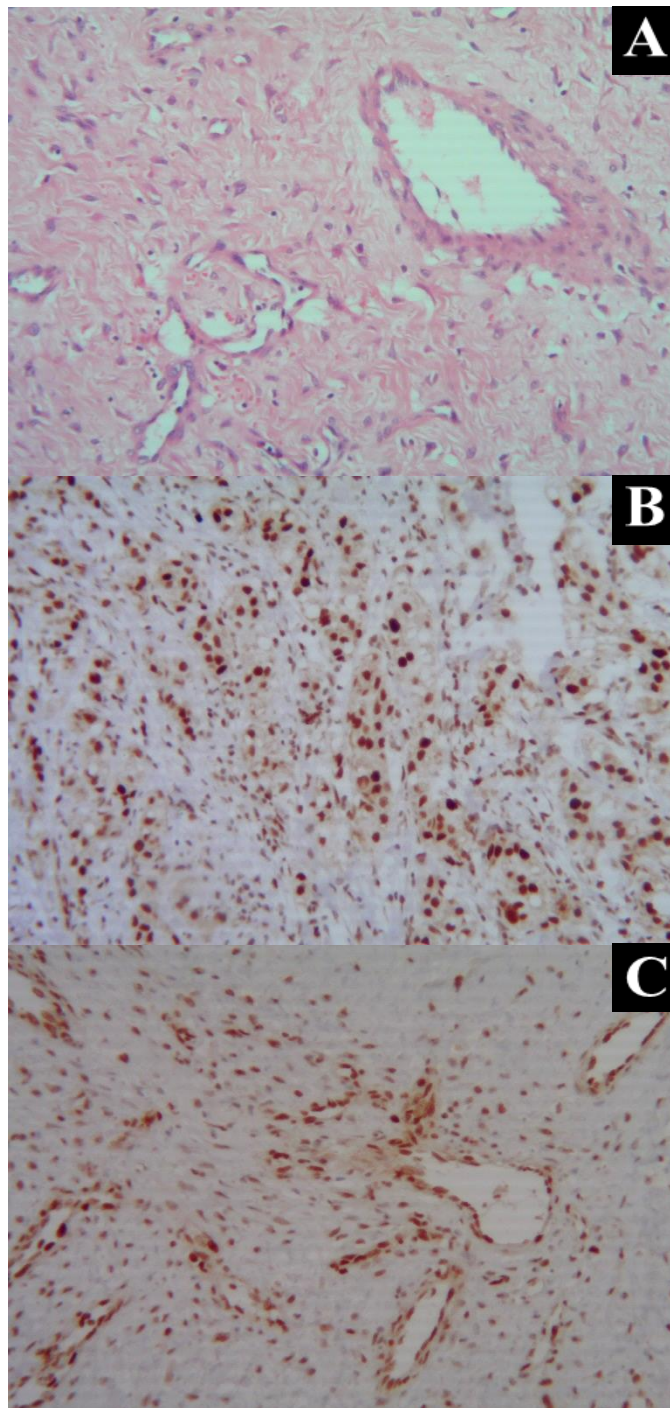


Figura 12. Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 11. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (++++). por IHQ.

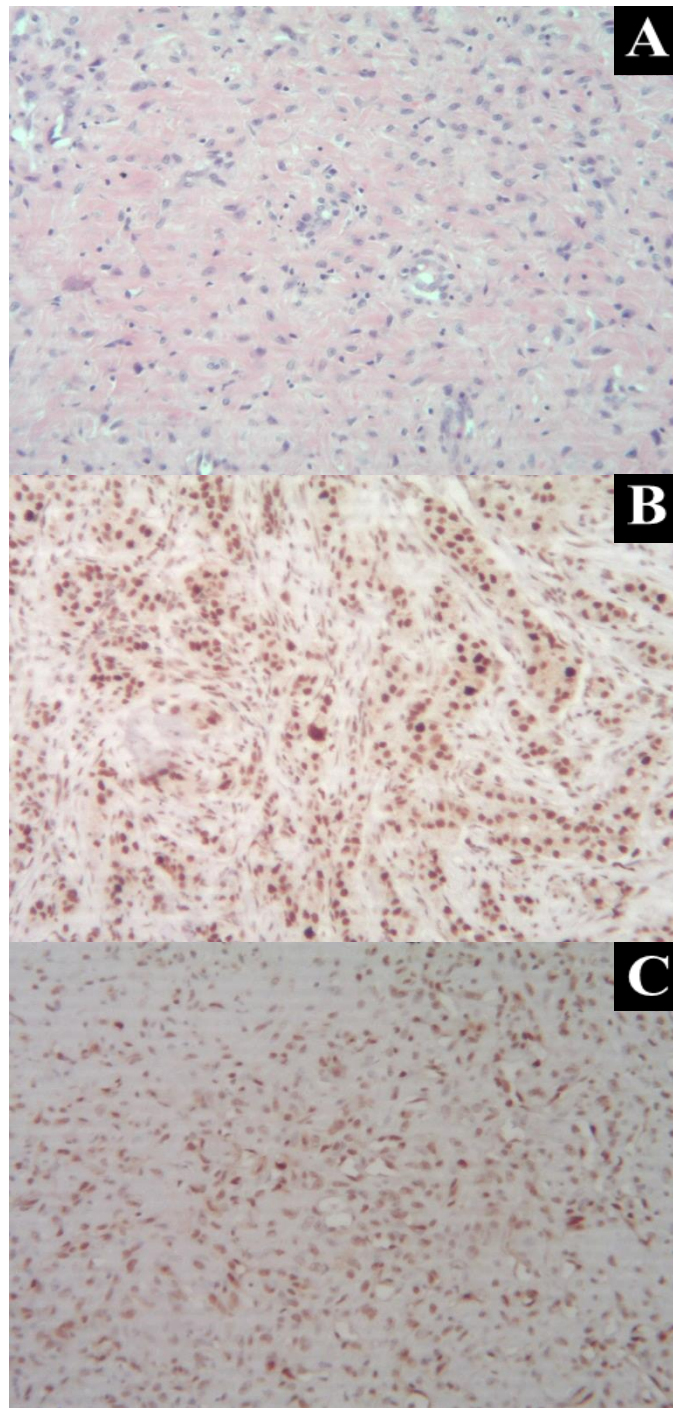


Figura 13. Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 12. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++) por IHQ.

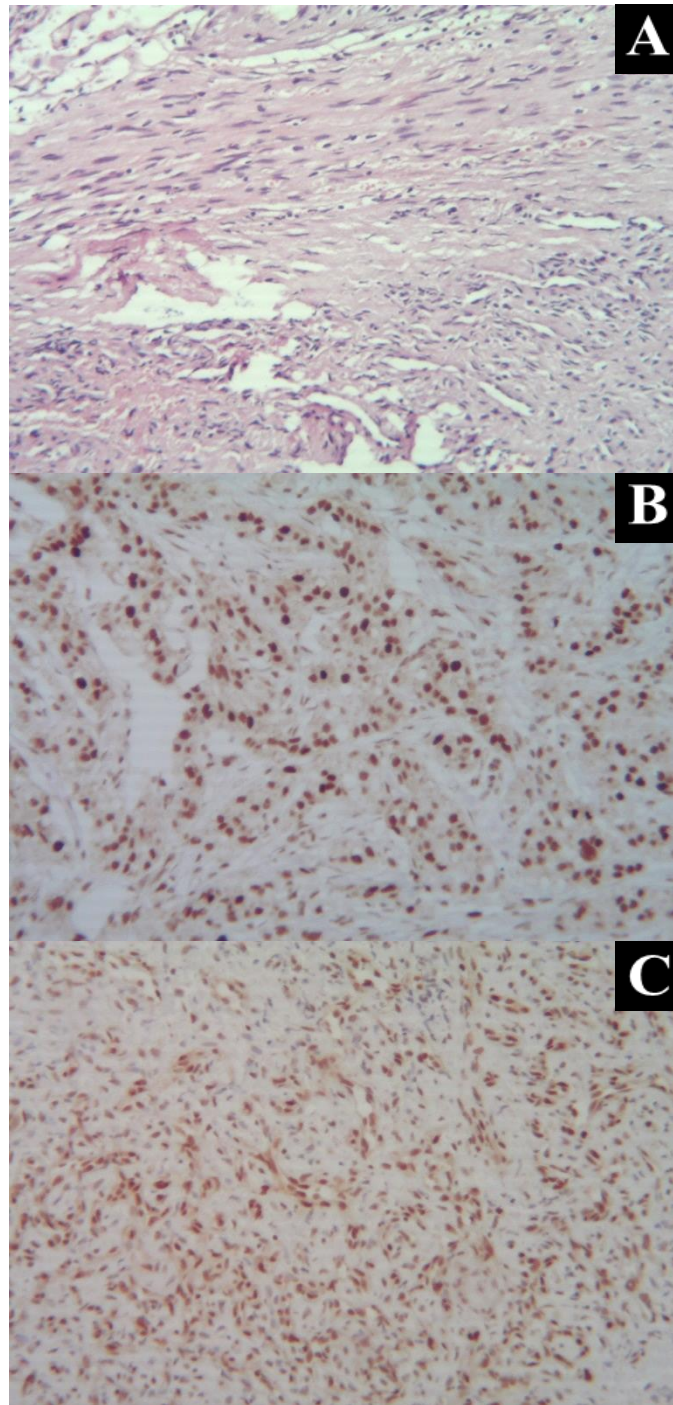


Figura 14. Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 16. El tumor es negativo para VPH y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama. C) Expresión nuclear de pRb (+++) por IHQ.

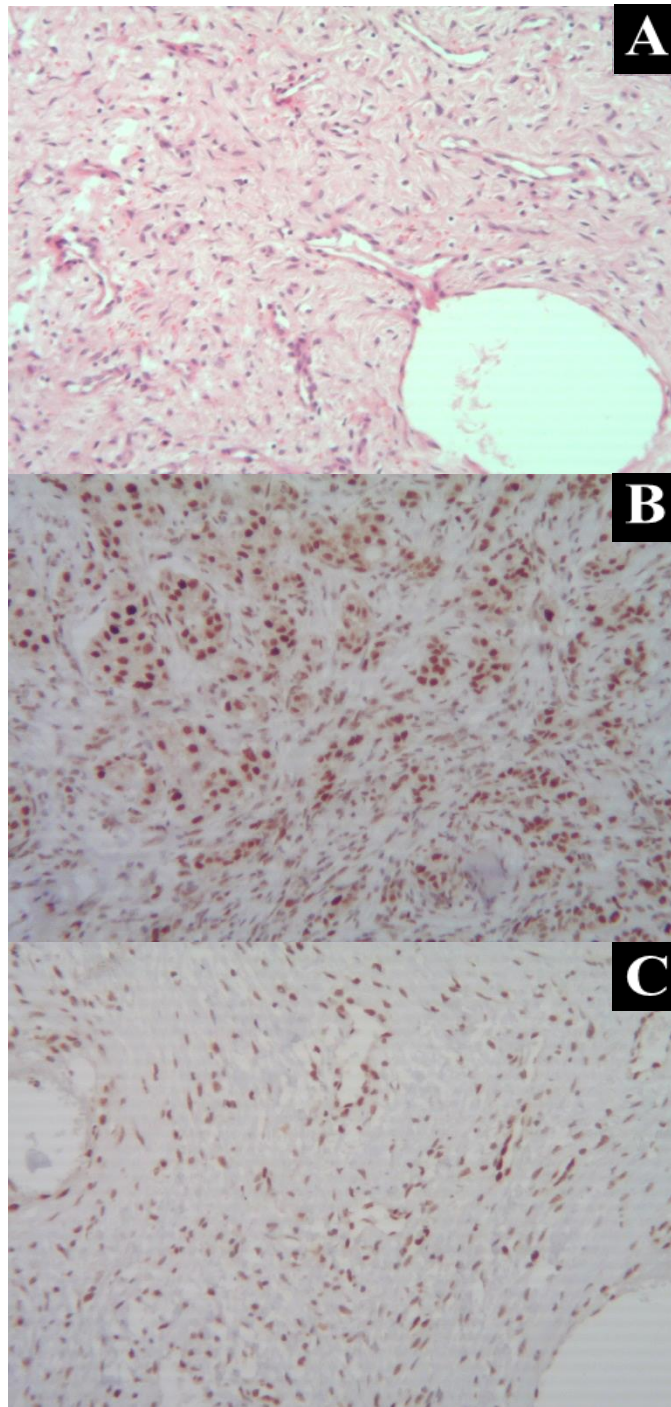


Figura 15. Tinción IHQ para pRb en ANJ del paciente No. 19. El tumor es positivo para VPH 11 y negativo para VEB. A) Tinción del tumor con hematoxilina y eosina. B) Expresión de pRb por IHQ en tumor de mama.C) Expresión nuclear de pRb (++++) por IHQ.

7.8 Evaluación de la expresión de pRb y p16^{INK4a} en ANJ con respecto a las características clínico-histopatológicas.

En la evaluación de la expresión de pRb por IHQ de los 24 casos de ANJ se encontró que 1 de ellos presentaba extensa necrosis, por lo que fue descartado para la medición de este parámetro. De los 23 casos evaluados de ANJ, 14 (60.9%) resultaron positivo (>25% de células teñidas) para la expresión pRb. No se observó diferencia significativa entre la Edad y la expresión de pRb ($p=0.334$). En cuanto al grado del tumor, según el estadio de Andrews, 11 (47.8%) de los 23 casos presentaron estadio II, 5 (21.7%) de los cuales resultaron positivo para la expresión de pRb. 6 (26.1%) de los 23 casos presentaron estadio IIIA, 5 (35.7%) de los cuales resultaron positivo para la expresión de pRb. 4 (17.4%) de los 23 casos presentaron estadio IIIB, 3 (13%) de esos casos presentaron expresión de pRb. 2 (8.7%) de los 23 casos presentaron estadio IVB, siendo sólo 1 (4.3%) caso positivo para la expresión de pRb. No se observó diferencia significativa entre el estadio de Andrews y la expresión de pRb ($p=0.574$) (Tabla 12).

Tabla 12. Evaluación de la expresión de pRb con respecto a características clínico-histopatológicas.

	Total		pRb				
	(n=23)		Positivo (n=14)		Negativo (n=9)		<i>p</i>
Edad (años) ^a	16 [10-28]		13.5 [10-28]		19 [10-22]		0.334
Embolización							0.228
Si	14	60.9%	7	30.4%	7	30.4%	
No	9	39.1%	7	30.4%	2	8.7%	
Estadio de Andrews							0.574
I	-	-	-	-	-	-	
II	11	47.8%	5	21.7%	6	26.1%	
IIIA	6	26.1%	5	21.7%	1	4.3%	
IIIB	4	17.4%	3	13%	1	4.3%	
IVA	-	-	-	-	-	-	
IVB	2	8.7%	1	4.3%	1	4.3%	

^aSe presenta la edad al inicio de los Síntomas [rango].

En la evaluación de la expresión de p16^{INK4a} por IHQ de los 24 casos de ANJ se encontró que 1 de ellos presentaba extensa necrosis, y 3 de ellas resultaron indeterminables, por lo que las 4 se descartaron para la medición de este parámetro. De los 20 casos evaluados de ANJ, 2 (10%) resultaron positivo (>25% de células teñidas) para la expresión p16^{INK4a}. No se observó diferencia significativa entre la Edad y la expresión de p16^{INK4a} ($p=0.330$). En cuanto al grado del tumor, según el estadio de

Andrews, 9 (45%) de los 20 casos presentaron estadio II, 1 (5%) de los cuales resultó positivo para la expresión de p16^{INK4a}. 5 (25%) de los 20 casos presentaron estadio IIIA. 4 (20%) de los 20 casos presentaron estadio IIIB, 1 (5%) de esos casos presentó expresión de p16^{INK4a}. 2 (10%) de los 20 casos presentaron estadio IVB. No se observó diferencia significativa entre el estadio de Andrews y la expresión de p16^{INK4a} ($p=0.953$) (**Tabla 13**).

Tabla 13. Evaluación de la expresión de p16^{INK4a} con respecto a características clínico-histopatológicas.

	Total		p16 ^{INK4a}				<i>p</i>
	(n=20)		Positivo (n=2)		Negativo (n=18)		
Edad (años) ^a	15.5 [10-28]		17.5 [15-20]		13 [10-23]		0.330
Embolización							1.000
Si	13	65%	1	5%	12	60%	
No	7	35%	1	5%	6	30%	
Estadio de Andrews							0.953
I	-	-	-	-	-	-	
II	9	45%	1	5%	8	40%	
IIIA	5	25%	-	-	5	25%	
IIIB	4	20%	1	5%	3	15%	
IVA	-	-	-	-	-	-	
IVB	2	10%	-	-	2	10%	

^aSe presenta la edad al inicio de los Síntomas [rango].

7.9 Análisis de la expresión de pRb y p16^{INK4a} en ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.

De los 23 casos estudiados para la expresión de pRb 14 (60.9%) fueron positivos, 1 (4.3%) de los 14 resultó positivo para la presencia del ADN del VPH. Entre los 9 casos negativos para la expresión de pRb, 2 (8.7%) casos resultaron positivo para VPH-AR y 1 (4.3%) positivo para VEB. No se observó diferencia significativa entre la expresión de pRb y la presencia de los virus ($p=0.538$, $p=0.142$, $p=0.409$; respectivamente). En cuanto a la intensidad de la expresión de pRb, 3 (13%) de los 23 casos presentaron un resultado negativo, que se traduce en no reactividad nuclear. 2 (8.7%) de los 23 casos presentaron una cruz de intensidad (+), de los cuales 1 (4.3%) resultó positivo para VPH-AR. 6 (26.1%) de los 23 casos presentaron dos cruces de intensidad (++), de los cuales 1 (4.3%) fue positivo para VPH-AR y 1 (4.3%) para VEB. 7 (30.4%) de los 23 casos presentaron tres cruces de intensidad

(+++). Mientras que cuatro cruces de intensidad en la expresión de pRb (++++) sólo se observó en 5 (21.7%) de los 23 casos, siendo 1 (4.3%) positivo para VPH. No se observó diferencia significativa entre la intensidad de la expresión y la presencia de los virus ($p=0.266$, $p=0.054$, $p=0.349$; respectivamente). Sin embargo, la relación entre la intensidad de la expresión de pRb y la presencia de VPH-AR presenta un valor de p marginal (**Tabla 14**).

De los 20 casos estudiados para la expresión de p16^{INK4a} 2 (10%) fueron positivos, 1 (5%) de los 2 resultó positivo para la presencia del ADN del VPH, mientras que 1 (5%) positivo para VEB. Entre los 18 casos negativos para la expresión de p16^{INK4a}, 2 (10%) casos resultaron positivo para VPH-AR. No se observó diferencia significativa entre la expresión de p16^{INK4a} y la presencia de los virus ($p=0.284$, $p=1.00$, $p=0.105$; respectivamente). En cuanto a la intensidad de la expresión de p16^{INK4a}, 5 (25%) de los 20 casos presentaron una cruz de intensidad (+), de los cuales 2 (10%) resultaron positivo para VPH-AR. 10 (50%) de los 20 casos presentaron dos cruces de intensidad (++), de los cuales 1(5%) fue positivo para VEB. 5 (25%) de los 20 casos presentaron tres cruces de intensidad (+++), siendo 1 (5%) positivo para VEB. No se observó diferencia significativa entre la intensidad de la expresión y la presencia de VPH y VEB ($p=0.388$, $p=0.939$; respectivamente). La relación entre la intensidad de la expresión de p16^{INK4a} y la presencia de VPH-AR presenta un valor de $p>0.05$ (0.04) (**Tabla 15**).

Tabla 14. Expresión e intensidad de pRb en 23 casos de ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.

	Total (n=23)		Virus del Papiloma Humano				Virus del Papiloma Humano de alto riesgo				Virus de Epstein-Barr			
			Positivo (n=3)		Negativo (n=20)		Positivo (n=2)		Negativo (n=21)		Positivo (n=1)		Negativo (n=22)	
Expresión pRb							0.538				0.142			0.409
Positivo	14	60.9%	1	4.3%	13	56.5%	-	-	14	60.9%	-	-	14	60.9%
Negativo	9	39.1%	2	8.7%	7	30.4%	2	8.7%	7	30.4%	1	4.3%	8	34.8%
Intensidad pRb							0.266				0.054			0.349
Negativo	3	13%	-	-	3	13%	-	-	3	13%	-	-	3	13%
+	2	8.7%	1	4.3%	1	4.3%	1	4.3%	1	4.3%	-	-	2	8.7%
++	6	26.1%	1	4.3%	5	21.7%	1	4.3%	5	21.7%	1	4.3%	5	21.7%
+++	7	30.4%	-	-	7	30.4%	-	-	7	30.4%	-	-	7	30.4%
++++	5	21.7%	1	4.3%	4	17.4%	-	-	5	21.7%	-	-	5	21.7%

Tabla 15. Expresión e intensidad de p16^{INK4a} en 20 casos de ANJ con y sin infección por VPH, VPH-AR y VEB.

	Total		Virus del Papiloma Humanoi				Virus del Papiloma Humano de alto riesgo				Virus de Epstein-Barr			
			Positivo		Negativo		Positivo		Negativo (n=18)		Positivo		Negativo	
	(n=20)	(n=3)	(n=17)	<i>p</i>	(n=2)				<i>p</i>	(n=1)	(n=19)	<i>p</i>		
Expresión p16 ^{INK4a}				0.284					1.00			0.105		
Positivo	2	10%	1	5%	1	5%	-	-	2	10%	1	5%	1	5%
Negativo	18	90%	2	10%	16	80%	2	10%	16	80%	-	-	18	90%
Intensidad p16 ^{INK4a}				0.388					0.040			0.939		
Negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+	5	25%	2	10%	3	15%	2	10%	3	15%	-	-	5	25%
++	10	50%	-	-	10	50%	-	-	10	50%	1	5%	9	45%
+++	5	25%	1	5%	4	20%	-	-	5	25%	-	-	5	25%
++++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

8. DISCUSIÓN

Desde su primera mención en los registros médicos griegos del siglo IV a. de C., se ha clasificado al Angiofibroma nasofaríngeo como un tumor con origen en el periostio de la base del cráneo, otros autores lo catalogaron como hipertrofia del periostio en respuesta a una influencia hormonal, también lo llegaron a describir como una clase de respuesta inflamatoria o inmunológica del organismo, con probable origen alérgico, sin embargo, 24 siglos después aún no se conoce a ciencia cierta la patogénesis de este tumor (Hernández Alarcón & Hernández González, 2011). Una de las principales características de este tumor benigno es su presentación casi exclusiva en adolescentes masculinos, es cierto que existen reportes de incidencia en mujeres o de casos a los 2, 4, 67 y 70 años, pero son reportes controversiales tanto en la incidencia de ANJ como en el número de casos en mujeres, probablemente debido a la falta de selección crítica adecuada de los casos y algunos de estos estudios ni siquiera presentan información histológica o algún otro dato que sirva para confirmar que es un caso verdadero de ANJ (Martin, Ehrlich, & Abels, 1946). La gran mayoría de los estudios de ANJ son 100% hombres y con rangos de edad entre 11-33 años (Renkonen et al., 2011), 8-41 años (Y. Huang et al., 2013), 9-41 años (Liu et al., 2015), 10-24 años (Glad et al., 2007), 10-36 años (Petruson, Rodriguez-Catarino, Petruson, & Finizia, 2002), 10-34 (Saylam, Yücel, Sungur, & Önerci, 2006). En el presente estudio logramos conjuntar un grupo de estudio de 24 casos de ANJ, con un 100% de pacientes masculinos de entre 10 y 28 años, con una mediana de 15.5 años, consistente al rango de edad reportado en la mayoría de los estudios y en el que se presenta más comúnmente al ANJ.

Siendo un padecimiento tan restringido, pues se presenta casi exclusivamente en hombres y en el rango de edad característico de la pubertad y la madurez sexual, el abordaje hormonal siempre fue la opción número uno a la hora de investigar el origen del padecimiento, pero con resultados controversiales siempre (Liu et al., 2015). Renkonen y colaboradores en 2015 abordaron el problema desde la perspectiva de los receptores tipo Toll, y encontraron asociación entre la negatividad de la expresión de TLR 3 con la invasividad del tumor (Renkonen, Cardell, Mattila, & Lundberg, 2015). La presencia de los receptores tipo Toll, los cuales son cruciales en la respuesta inmune innata a patógenos, reconocen y responden a los PAMPs (Xagorari & Chlichlia, 2008), en muestras de ANJ sugiere que la etiología del ANJ puede ser abordada desde una perspectiva diferente, lo que justamente realizaron Román en 2008 y Mishra en 2016 (Mishra, Sachadeva, Jain, Shukla, & Pandey, 2016; Román et al., 2008) quienes evaluaron muestras de ANJ para determinar la presencia de virus oncogénicos. En el caso de Román, su estudio fue realizado con una n de 15 casos de ANJ, que

consistían en un 100% a varones de entre 8 y 23 años. Mediante PCR detectaron VEB en 5 de los 15 casos, sin embargo, mediante hibridación in situ EBER-ISH no se detectó la presencia de ARN de VEB, lo que se traduce en VEB no activo en el sitio del tumor. Concluyen que la detección de ADN de VEB mediante PCR es un falso positivo, ya que se detecta el DNA del VEB debido a la presencia de linfocitos presentes en el estroma (Román et al., 2008). En este estudio encontramos la prevalencia de VEB en 1 (5.9%) de las 24 muestras de ANJ (**Tabla 8**) mediante qPCR, este resultado por si solo habla de la baja presentación de este virus en muestras de ANJ, y no se observa diferencia significativa entre la presencia del VEB y el estadio tumoral, la expresión de pRb y la expresión de p16^{INK4a} ($p>0.465$, $p>0.409$, $p>0.105$ respectivamente). La presencia de 1 caso de ANJ positivo para VEB puede explicarse como presencia de linfocitos en el estroma, por lo que no sería VEB activo en el sitio de la lesión ni relacionado de manera alguna a la lesión, como se representa estadísticamente.

Se han identificado más de 200 genotipos del VPH que, dependiendo del potencial que tienen para provocar lesiones cancerígenas, algunos de ellos han sido clasificados en el grupo de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 y 56) o en el grupo de bajo riesgo (6, 11, 40, 42, 53, 54 y 57) (Bharadwaj, Hussain, Tripathi, Singh, & Mehrotra, 2014). Nosotros encontramos una prevalencia del 8.3% de casos positivos para genotipos de alto riesgo del VPH en ANJ. Sin embargo, no se observó asociación estadística significativa ($p<0.05$) con factores de Edad, embolización o estadio tumoral.

En el estudio de Mishra en 2016 evaluaron 6 muestras de ANJ para detectar la presencia de VPH mediante inmunohistoquímica, PCR y western blot. Mediante inmunohistoquímica se detectó la presencia de VPH en 4 muestras, mediante PCR detectaron la presencia de VPH en 3 muestras y mediante western blot detectaron la presencia de VPH en 4 muestras, al realizar la evaluación general de las 3 técnicas encontraron una presencia de VPH en el 100% de sus muestras de ANJ (Mishra et al., 2016). En este estudio pudimos detectar la presencia de VPH en 4 de las 24 muestras de ANJ, lo que nos resultó en una prevalencia del 16.7%.

A diferencia de Mishra, nosotros evaluamos la presencia de VPH mediante INNO-LiPA, esta técnica permitió incluso la detección de los genotipos específicos de VPH presentes en las muestras, lo que resultó en la detección de los genotipos 11 y 6 en dos muestras, ambos genotipos son considerados de bajo riesgo (Lacey, Lowndes, & Shah, 2006). Las otras dos muestras que resultaron positivo para la presencia de VPH estaban infectadas con los genotipos 58 y 82. El genotipo 58 está clasificado como VPH de alto riesgo debido a la prevalencia de este genotipo en varios tipos de cáncer y a su

relación filogenética con otros genotipos de alto riesgo. En el caso del genotipo 82, este ha sido reportado como un VPH de probable alto riesgo, los genotipos considerados como probable alto riesgo son considerados así debido a la falta de datos clínicos que permitan asociarlos a tumores en pacientes, principalmente por su baja incidencia, sin embargo, en análisis filogenéticos de estos genotipos se ha observado su relación cercana con los genotipos de alto riesgo del VPH (Chan et al., 1999; S. Huang, Afonina, Miller, & Beckmann, 1997).

pRb y p16^{INK4a} son dos proteínas de supresión tumoral, y ambas forman parte de la vía de señalización de p16^{INK4a}-Retinoblastoma (Gaubatz et al., 2000). En el caso de p16^{INK4a}, Antonsson en 2015 realizó un estudio de 248 casos de carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC), encontrando 50 casos positivos para VPH, de los cuales 44 (88%) resultaron positivos también para la sobreexpresión de p16^{INK4a}. Lograron observar que la positividad de VPH en carcinoma escamoso orofaríngeo esta muy relacionado con la sobreexpresión de p16^{INK4a} ($p < 00001$) (Antonsson et al., 2015). En numerosos estudios en cáncer cervical, tumores de cabeza y cuello y lesiones perianales se ha usado a la sobreexpresión de p16^{INK4a} como herramienta diagnóstica, e incluso se ha encontrado asociada la infección de genotipos del VPH-AR (Mulvany, Allen, & Wilson, 2008; Romagosa et al., 2011).

Los pacientes 9 y 22 en el presente estudio presentaron infección positiva por VPH-AR, sin embargo, la expresión de p16^{INK4a} fue baja en ambos casos (20%), mientras que la expresión de pRb fue del 10% y 25% (respectivamente). En los genotipos de alto riesgo del VPH, la oncoproteína viral E7 inactiva a la proteína de supresión tumoral pRb (Feller, Khammissa, Wood, & Lemmer, 2009; Münger et al., 1989; Romagosa et al., 2011). pRb es una fosfoproteína nuclear que tiene un papel importante en la regulación del ciclo celular y la pérdida de su función induce una proliferación celular descontrolada (Noraini, Siti-Aishah, & Kwan, 2003). Raju y colaboradores en 2015, determinaron la expresión de pRb en carcinoma de células escamosas en cérvix, donde obtuvieron que el 73% de las muestras se mostraron positivas y en 27% de los casos no se mostró tinción (Raju et al., 2015). La inactivación de pRb por parte de E7 libera a p16^{INK4a} del control mediante feedback negativo, lo que provoca un incremento en los niveles de expresión de p16^{INK4a} como intento de inhibir la replicación celular descontrolada (Reuschenbach et al., 2008).

En el caso del VEB, el único caso positivo corresponde al paciente No. 1, el cual presentó una expresión del 80% para p16^{INK4a} y 10% en el caso de pRb. La vía de señalización de p16^{INK4a}-Retinoblastoma también se ve afectada por las oncoproteínas virales del VEB, como es el caso de

LMP1 y EBNA-5. LMP1 se ha descrito como una proteína viral transformante, y es esencial para la immortalización de los linfocitos B infectados por VEB (Dawson, Port, & Young, 2012). Othani y su grupo de trabajo en 2015 identificaron el mecanismo mediante el cual LMP1 reduce la expresión de p16^{INK4a}. Descubrieron que LMP1 induce el secuestro citoplásmico del factor de transcripción Ets2 por acción de la Exportina 1, factor de transcripción necesario para la expresión de p16^{INK4a}, el fenotipo observado en las células es una reducción en la expresión de esta proteína de supresión tumoral. LMP1 también afecta a los factores de transcripción E2F4 y E2F5, los cuales promueven la transcripción de proteínas necesarias para la replicación del DNA en la fase S del ciclo celular. E2F4/5 interactúan con la proteína de supresión tumoral pRb, una vez en complejo la actividad de estos factores de transcripción es inhibida hasta que la célula está lista para la replicación del DNA y mediante metilaciones en pRb los factores de transcripción E2F4/5 se liberan de la inhibición mediada por pRb y permiten el avance del ciclo celular (Dawson et al., 2012; Ohtani et al., 2003; Romagosa et al., 2011)

La información disponible sobre la vía de señalización p16^{INK4a}-Retinoblastoma y la actividad de las oncoproteínas virales E7 y LMP1 del VPH y del VEB (respectivamente), indica que existe relación entre los niveles de expresión de las proteínas de supresión tumoral p16^{INK4a} y pRb. En este estudio no se observó significancia estadística entre los casos de ANJ infectados VPH, VPH-AR y VEB y la expresión de la proteína de supresión tumoral pRb ($p=0.538$, $p=0.142$, $p=0.409$; respectivamente) (**Tabla 14**). Del mismo modo, no se observó significancia estadística entre la expresión de la proteína de supresión tumoral p16^{INK4a} y los casos de ANJ infectados por VPH, VPH-AR y VEB en este estudio ($p=0.284$, $p=1.00$, $p=0.105$; respectivamente). Este hallazgo indica que la actividad de estos virus oncogénicos en ANJ puede ser nula, y una manera en la que puede abordarse es midiendo los niveles de expresión de las oncoproteínas virales E7 y LMP1 directamente.

La presencia del VEB en ANJ tanto en nuestro estudio como en la literatura apunta a que no existe asociación entre este virus y el desarrollo del ANJ. Por otra parte, existe muy poca literatura que estudia a los virus oncogénicos en ANJ, y aunque hay evidencias de la presencia que estos tienen en este tipo de tumor benigno, son muy escasos como para permitir realizar una inferencia científica en base al rol que estos virus juegan en el desarrollo del ANJ. En el caso del VPH, el resultado reportado por Mishra es difícilmente significativo debido a la n de 6 pacientes. El resultado encontrado en nuestro estudio sugiere que no hay asociación entre VPH y el desarrollo de ANJ, y la presencia de

los positivos detectados en el estudio es un factor para estudiar como un evento independiente según la evidencia estadística.

9. CONCLUSIONES

- La prevalencia de infección por VPH en ANJ fue del 16.7% y no se encontró presencia de este virus en los casos de glándulas adenoides que se incluyeron como grupo control.
- Se identificaron los genotipos de bajo riesgo 6 y 11 del VPH en ANJ.
- Se identificaron los genotipos de alto riesgo 58 y 82 del VPH en ANJ.
- Un caso de ANJ (4.2%) resultó positivo para la presencia de ADN del VEB, contrastando con una prevalencia del 66.7% en el grupo control.
- No se identificaron coinfecciones entre genotipos del VPH y/o el VEB en ANJ.
- No se encontró una asociación significativa entre la presencia del VPH, sus diferentes genotipos y la infección por VEB con factores como la edad, la embolización, y el estadio tumoral en pacientes con ANJ.
- No se encontró una asociación significativa entre la presencia de infección por VPH, VPH-AR y VEB en pacientes con ANJ y la expresión de la proteína p16^{INK4a} evaluada mediante tinción inmunohistoquímica.
- No se encontró una asociación significativa entre la presencia de infección por VPH, VPH-AR y VEB en pacientes con ANJ y la expresión de la proteína pRb evaluada mediante tinción inmunohistoquímica.

10. REFERENCIAS

- Ahmed, H., Mustafa, S. A., Eltom, F. M., & Babiker, A. Y. (2012). Frequency and genotype of human papillomavirus among Sudanese patients with head and neck tumours. *Ecancermedicalscience*, 6. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3512557/>
- Antonsson, A., Neale, R. E., Boros, S., Lampe, G., Coman, W. B., Pryor, D. I., ... Whiteman, D. C. (2015). Human papillomavirus status and p16^{INK4A} expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland, Australia. *Cancer Epidemiology*, 39(2), 174–181. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2015.01.010>
- Bernal-sprekelsen. (2007). Angiofibroma juvenil. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 58, 84–95.
- Best, S., Niparko, K., & Pai, S. (2012). Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 45(4), 807–822. Retrieved from [https://www.oto.theclinics.com/article/S0030-6665\(12\)00053-9/abstract](https://www.oto.theclinics.com/article/S0030-6665(12)00053-9/abstract)
- Bharadwaj, M., Hussain, S., Tripathi, R., Singh, N., & Mehrotra, R. (2014). Human Papillomavirus (HPV): Diagnosis and Treatment. In A. S. Verma & A. Singh (Eds.), *Animal Biotechnology Models in Discovery and Translation*. <https://doi.org/10.17226/10418>
- Blount, A., Riley, K. O., & Woodworth, B. A. (2011). Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma. *Journal of Otolaryngologic Clinics of North America*, 44, 989–1004. <https://doi.org/10.1097/MPH.0000000000000568>
- Burkitt, D. (1961). Malignant lymphoma in African children. *Cancer*.
- Burkitt, D. (1962a). A children's cancer dependent on climatic factors. *Nature*, 194(4825), 232–234. <https://doi.org/10.1038/194232a0>
- Burkitt, D. (1962b). Determining the climatic limitations of a children's cancer common in Africa. *British Medical Journal*, 2(5311), 1019–1023. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.5311.1019>
- Burkitt, D., & Wright, D. (1966). Geographical and Tribal Distribution of the African Lymphoma in Uganda. *British Medical Journal*, 1(5487), 569–573. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5487.569>
- Bzhalava, D., Guan, P., Franceschi, S., Dillner, J., & Clifford, G. (2013). A systematic review of the prevalence of mucosal and cutaneous human papillomavirus types. *Virology*, 445(1–2), 224–231. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.015>

- Chan, P. K. S., Li, W.-H., Chan, M. Y. M., Ma, W.-L., Cheung, J. L. K., & Cheng, A. F. (1999). High Prevalence of Human Papillomavirus Type 58 in Chinese Women With Cervical Cancer and Precancerous Lesions. *Journal of Medical Virology*, 59, 232–238. <https://doi.org/10.1561/22000000016>
- Chavolla-Magaña, R., Labra, A., & Huerta-Delgado, A. D. (2003). Angiofibroma juvenil nasofaríngeo. Metaanálisis de su tratamiento. *Revista Médica Del Hospital General de México*, 66(2), 71–79.
- Daud, I. I., Scott, M. E., Ma, Y., Shiboski, S., Farhat, S., & Moscicki, A. B. (2011). Association between toll-like receptor expression and human papillomavirus type 16 persistence. *International Journal of Cancer*, 128(4), 879–886. <https://doi.org/10.1002/ijc.25400>
- Dawson, C. W., Port, R. J., & Young, L. S. (2012). The role of the EBV-encoded latent membrane proteins LMP1 and LMP2 in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Seminars in Cancer Biology*, 22(2), 144–153. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2012.01.004>
- De Nardo, D. (2015). Toll-like receptors: Activation, signalling and transcriptional modulation. *Cytokine*, 74(2), 181–189. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2015.02.025>
- Dohar, J. E., & Duvall, A. J. (1992). Spontaneous regression of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 101(6), 469–471. <https://doi.org/10.1177/000348949210100603>
- Epstein, M. A., Achong, B. G., & Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts From Burkitt's Lymphoma. *The Lancet*, 283(7335), 702–703. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)91524-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)91524-7)
- Epstein, M. A., & Barr, Y. M. (1964). Cultivation in Vitro of Human Lymphoblasts From Burkitt's Malignant Lymphoma. *The Lancet*, 283(7327), 252–253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(64\)92354-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(64)92354-2)
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: A booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35 REV. ISS. 3), 5427–5440. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205600>
- Fatih Garca, M., Ari Yuca, S., & Yuca, K. (2010). Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma. *European Journal of General Medicine*, 7.
- Feller, L., Khammissa, R. A., Wood, N. H., & Lemmer, J. (2009). Epithelial maturation and molecular

- biology of oral HPV. *Infectious Agents and Cancer*, 4(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-4-16>
- Foulongne, V., Sauvage, V., Hebert, C., Dereure, O., Cheval, J., Gouilh, M. A., ... Eloit, M. (2012). Human skin Microbiota: High diversity of DNA viruses identified on the human skin by high throughput sequencing. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038499>
- Gaubatz, S., Lindeman, G. J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J. R., Livingston, D. M., & Rempel, R. E. (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Molecular Cell*, 6(3), 729–735. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)00071-X](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)00071-X)
- Gemmete, J. J., Ansari, S. A., McHugh, J., & Gandhi, D. (2009). Embolization of Vascular Tumors of the Head and Neck. *Neuroimaging Clinics of North America*, 19(2), 181–198. <https://doi.org/10.1016/j.nic.2009.01.008>
- Gildener-Leapman, N., Lee, J., & Ferris, R. L. (2014). Tailored immunotherapy for HPV positive head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncology*, 50(9), 780–784. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.010>
- Girgis, I. H., & Fahmy, S. A. (1973). Nasopharyngeal fibroma: its histo-pathological nature. *The Journal of Laryngology & Otology*, 87(11), 1107–1123. <https://doi.org/10.1017/S002221510007804X>
- Glad, H., Vainer, B., Buchwald, C., Petersen, B. L., Theilgaard, S. A., Bonvin, P., ... Jakobsen, J. (2007). Juvenile nasopharyngeal angiofibromas in Denmark 1981-2003: Diagnosis, incidence, and treatment. *Acta Oto-Laryngologica*, 127(3), 292–299. <https://doi.org/10.1080/00016480600818138>
- Harma, R. A. (1958). Nasopharyngeal angiofibroma. A clinical and histopathological study. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 146, 1–74. Retrieved from <http://ci.nii.ac.jp/naid/10009523125/en/>
- Hernández Alarcón, V. J., & Hernández González, S. (2011). Nasoangiofibroma juvenil: una revisión actualizada del diagnóstico, clasificación y tratamiento. *Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de Cabeza y Cuello*, 39(3), 147–157.
- Herrero, M., de Leyva, P., Sagüillo, K., Villegas, D., Picón, M., & Acero, J. (2015). Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Presentation of a case. *Revista Espanola de Cirugia Oral y Maxilofacial*, 37(2), 119–121. <https://doi.org/10.1016/j.maxilo.2014.03.010>
- Huang, S., Afonina, I., Miller, B. A., & Beckmann, A. M. (1997). Human papillomavirus types 52

- and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *International Journal of Cancer*, 70(4), 408–411. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19970207\)70:4<408::AID-IJC6>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19970207)70:4<408::AID-IJC6>3.0.CO;2-#)
- Huang, Y., Liu, Z., Wang, J., Sun, X., Yang, L., & Wang, D. (2013). Surgical management of juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Analysis of 162 cases from 1995 to 2012. *Laryngoscope*, 124(8), 1942–1946. <https://doi.org/10.1002/lary.24522>
- Jones, J. F., Shurin, S., Abramowsky, C., Tubbs, R. . R. et al. (1988). T-cell lymphomas containing Epstein–Barr viral DNA in patients with chronic Epstein–Barr virus infections. *The New England Journal of Medicine*, 318(12), 733–741.
- Kang, J. Y., & Lee, J.-O. (2011). Structural Biology of the Toll-Like Receptor Family. *Annual Review of Biochemistry*, 80(1), 917–941. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052909-141507>
- Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., Kreimer, A. R., Clifford, G. M., Boyle, P., & Franceschi, S. (2005). Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide : A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(February), 467–475.
- Kutok, J. L., & Wang, F. (2006). Spectrum of Epstein-Barr Virus–Associated Diseases. *The Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 375–404.
- Ley-Mandujano, S. S., & Campos-Navarro, L. A. (2014). Patrón histológico del nasoangiofibroma en pacientes del Centro Médico Nacional La Raza. *Anales de Otorrinolaringología Mexicana*, 59(3), 165–170.
- Lacey, C. J. N., Lowndes, C. M., & Shah, K. V. (2006). Chapter 4: Burden and management of non-cancerous HPV-related conditions: HPV-6/11 disease. *Vaccine*, 24(SUPPL. 3), 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.06.015>
- Liu, Zhuo fu, Wang, D. hui, Sun, X. cai, Wang, J. jing, Hu, L., Li, H., & Dai, P. dong. (2011). The site of origin and expansive routes of juvenile nasopharyngeal angiofibroma (JNA). *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 75(9), 1088–1092. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2011.05.020>
- Liu, Zhuofu, Wang, J., Wang, H., Wang, D., Hu, L., Liu, Q., & Sun, X. (2015). Hormonal receptors and vascular endothelial growth factor in juvenile nasopharyngeal angiofibroma:

- Immunohistochemical and tissue microarray analysis. *Acta Oto-Laryngologica*, 135(1), 51–57. <https://doi.org/10.3109/00016489.2014.952774>
- Maeda, E., Akahane, M., Kiryu, S., Kato, N., Yoshikawa, T., Hayashi, N., ... Ohtomo, K. (2009). Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: A pictorial review. *Japanese Journal of Radiology*, 27(1), 4–19. <https://doi.org/10.1007/s11604-008-0291-2>
- Makek, M. S., Andrews, J. C., & Fisch, U. (1989). Malignant transformation of a nasopharyngeal angiofibroma. *The Laryngoscope*, 99(10), 1088–1092.
- Makhasana, J. A. S., Kulkarni, M. A., Vaze, S., & Shroff, A. S. (2016). Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 20(2).
- Martin, H., Ehrlich, H. E., & Abels, J. C. (1946). Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma. *Annals of Surgery*, 127(3), 513–536.
- Medzhitov, R., & Janeway, C. A. (1997). *Innate Immunity : The Virtues of a Nonclonal System of Recognition*. 91, 295–298.
- Mishra, A., Sachadeva, M., Jain, A., Shukla, N. M., & Pandey, A. (2016). Human Papilloma virus in Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma: possible recent trend. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 37(4), 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2016.03.001>
- Mishra, S. C. (2000). Putative histogenesis of post nasal angiofibroma. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, 52(2), 118–121. <https://doi.org/10.1007/BF03000326>
- Mulvany, N. J., Allen, D. G., & Wilson, S. M. (2008). Diagnostic utility of p16^{INK4a}: A reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*, 40(4), 335–344. <https://doi.org/10.1080/00313020802035907>
- Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow, E., & Howley, P. M. (1989). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO Journal*, 8(13), 4099–4105. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08594.x>
- Na, R. K., Lin, Z., Kyong, R. K., Hyun, Y. C., & Kim, I. (2005). Epstein-barr virus and p16^{INK4A} methylation in squamous cell carcinoma and precancerous lesions of the cervix uteri. *Journal of Korean Medical Science*, 20(4), 636–642. <https://doi.org/10.3346/jkms.2005.20.4.636>

- Noraini, M. D., Siti-Aishah, M. A., & Kwan, S. W. (2003). An immunohistochemical study of retinoblastoma gene product in normal, premalignant and malignant tissues of the uterine cervix. *Malaysian Journal of Medicine Sciences*, 9(2), 52–59.
- Ohtani, N., Brennan, P., Gaubatz, S., Sanij, E., Hertzog, P., Wolvetang, E., ... Hara, E. (2003). Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16^{INK4a}–RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *The Journal of Cell Biology*, 162(2), 173–183. <https://doi.org/10.1083/jcb.200302085>
- Osborn, D. A. (1959). The So-Called Juvenile Angio-Fibroma of the Nasopharynx. *The Journal of Laryngology & Otology*, 73(05), 295–316. <https://doi.org/10.1017/s0022215100055341>
- Pandey, S., Kawai, T., & Akira, S. (2015). Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 3(Table 1), 1–18. <https://doi.org/10.101/cshperspect.a016246>
- Patel, P. J., Hieb, R. A., & Kelly, Q. S. (2014). Tumor Embolization. In R. S. Dieter, R. A. Dieter Jr., & R. A. Dieter III (Eds.), *Endovascular Interventions: A Case-Based Approach* (pp. 905–927). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7312-1_74
- Petruson, K., Rodriguez-Catarino, M., Petruson, B., & Finizia, C. (2002). Juvenile nasopharyngeal angiofibroma: Long-term results in preoperative embolized and non-embolized patients. *Acta Oto-Laryngologica*, 122(1), 96–100. <https://doi.org/10.1080/00016480252775814>
- Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., & Schwartz, A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: Targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene*, 19(51), 5944–5950. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203989>
- Renkonen, S., Cardell, L., Mattila, P., & Lundberg, M. (2015). Toll-like receptors 3 , 7 , and 9 in Juvenile nasopharyngeal angiofibroma. (11), 439–444. <https://doi.org/10.1111/apm.12366>
- Renkonen, S., Hagström, J., Vuola, J., Niemelä, M., Porras, M., Leivo, I., & Mäkitie, A. A. (2011). The changing surgical management of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 268(4), 599–607. <https://doi.org/10.1007/s00405-010-1383-z>
- Reuschenbach, M., Waterboer, T., Wallin, K. L., Eienkel, J., Dillner, J., Hamsikova, E., ... Wentzensen, N. (2008). Characterization of humoral immune responses against p16, p53, HPV16 E6 and HPV16 E7 in patients with HPV-associated cancers. *International Journal of*

- Cancer*, 123(11), 2626–2631. <https://doi.org/10.1002/ijc.23837>
- Romagosa, C., Simonetti, S., López-Vicente, L., Mazo, A., Lleonart, M. E., Castellvi, J., & Ramon y Cajal, S. (2011). p16 INK4a overexpression in cancer : a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*, 30(18), 2087–2097. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.614>
- Román, C., Thompson, L. D. R., Netto, A. C., Pimenta, L. G. G. S., de Fátima Correia-Silva, J., Gomes, C. C., & Gomez, R. S. (2008). Epstein-Barr virus and human herpes virus-8 are not associated with juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Head and Neck Pathology*, 2(3), 145–149. <https://doi.org/10.1007/s12105-008-0069-y>
- Ryan, J. L., Fan, H., Glaser, S. L., Schichman, S. a, Raab-Traub, N., & Gulley, M. L. (2004). Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments: a novel approach to screen for the virus in paraffin-embedded tissue and plasma. *The Journal of Molecular Diagnostics : JMD*, 6(4), 378–385. [https://doi.org/10.1016/S1525-1578\(10\)60535-1](https://doi.org/10.1016/S1525-1578(10)60535-1)
- Saylam, G., Yücel, O. T., Sungur, A., & Önerci, M. (2006). Proliferation, angiogenesis and hormonal markers in juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology*, 70(2), 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2005.06.007>
- Schick, B., Plinkert, P. K., & Prescher, A. (2002). Die vaskuläre komponente: Gedanken zur entstehung des angiofibroms. *Laryngo- Rhino- Otologie*, 81(4), 280–284. <https://doi.org/10.1055/s-2002-25322>
- Serrano, M. (1997). The Tumor Suppressor Protein p16 INK4a. *Experimental Cell Research*, 13(237), 7–13. <https://doi.org/10.1006/excr.1997.3824>
- Snyderman, C. H., & Pant, H. (2016). Endoscopic Management of Vascular Sinonasal Tumors, Including Angiofibroma. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 49(3), 791–807. <https://doi.org/10.1016/j.otc.2016.02.009>
- Stanley, M. A. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 215–222. <https://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
- Sternberg, S. S. (1954). Pathology of juvenile nasopharyngeal angiofibroma - a lesion of adolescent males. *Cancer*, 7(1), 15–28.
- Takeda, K., & Akira, S. (2018). *Toll-like receptors in innate immunity*. 17(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>

- Taylor, G. S., Long, H. M., Brooks, J. M., Rickinson, A. B., & Hislop, A. D. (2015). The Immunology of Epstein-Barr Virus–Induced Disease. *Annual Review of Immunology*, 33(1), 787–821. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112326>
- Udager, A., & McHugh, J. (2017). Human papillomavirus–associated neoplasms of the head and neck. *Surgical Pathology Clinics*, 10(1), 35–55. Retrieved from <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187591811630109X>
- Vojtechova, Z., Sabol, I., Salakova, M., Turek, L., Grega, M., Smahelova, J., ... Tachezy, R. (2016). Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *International Journal of Cancer*, 138(2), 386–395. <https://doi.org/10.1002/ijc.29712>
- Wang, D., Liebowitz, D., & Kieff, E. (1985). An EBV membrane protein expressed in immortalized lymphocytes transforms established rodent cells. *Cell*, 43(3 PART 2), 831–840. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90256-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90256-9)
- Weiss, L. M., Strickler, J. G., Warnke, R. A., Purtilo, D. T., & Sklar, J. (1987). Epstein-Barr viral DNA in tissues of Hodgkin's disease. *The American Journal of Pathology*, 129(1), 86–91.
- Weprin, L. S., & Siemers, P. T. (1991). Spontaneous regression of juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery*, 117, 796–799. <https://doi.org/10.1177/000348949210100603>
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., & Bosch, F. X. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRB cell cycle control. *Oncogene*, 21(10), 1510–1517. <https://doi.org/10.1038/sj/onc/1205214>
- Xagorari, A., & Chlichlia, K. (2008). *Toll-Like Receptors and Viruses : Induction of Innate Antiviral Immune Responses*. 49–59.
- Yi, Z., Fang, Z., Lin, G., Lin, C., Xiao, W., Li, Z., ... Zhou, A. (2013). Nasopharyngeal angiofibroma: A concise classification system and appropriate treatment options. *American Journal of Otolaryngology - Head and Neck Medicine and Surgery*, 34(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.amjoto.2012.10.004>
- Young, L. S., & Rickinson, A. B. (2004). Epstein-Barr virus: 40 Years on. *Nature Reviews Cancer*, 4(10), 757–768. <https://doi.org/10.1038/nrc1452>
- Zada, G., Lopes, M. B. S., Mukundan, S., & Laws, E. (2016). Juvenile Nasopharyngeal Angiofibroma

(JNA). *Atlas of Sellar and Parasellar Lesions: Clinical, Radiologic, and Pathologic Correlations*, 387–390. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-22855-6>

Zejnnullahu, V., & Zejnnullahu, V. (2017). Modulation of host immune response by human papillomaviruses and role of E6/E7 oncoproteins in development of cervical precursor lesions and cervical. *Research and Reports in Gynecology and Obstetrics*, 1(4), 6–13.

zur Hausen, H., Schulte-Holthausen, H., Klein, G., Henle, W., Henle, G., Clifford, P., & Santesson, L. (1970). EBV DNA in biopsies of Burkitt tumours and anaplastic carcinomas of the nasopharynx. *Nature*, 228(5276), 1056–1058.

11. RESUMEN BIOGRÁFICO

L.B.G. Juan Alonso Escalante Cortes

Optando por el título de
Maestro en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: Prevalencia y genotipos del Virus del Papiloma Humano, infección por Virus de Epstein-Barr y expresión de p16^{INK4a} y pRb en Angiofibroma Nasofaríngeo Juvenil de pacientes de una unidad médica de tercer nivel del noreste de México

Campo de estudio: Ciencias de la Salud.

Datos personales: Nacido en la ciudad de Monterrey, Nuevo León el 11 de enero de 1995; hijo de Juan Escalante Escalante y Laura Alicia Cortes Ríos.

Educación:

Licenciatura en Biotecnología Genómica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León

Experiencia profesional:

Estudiante adscrito a la Unidad de Infectología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL desde agosto de 2016, donde desempeñó diversas funciones como auxiliar, estudiante de servicio social y participó como estudiante del programa UANL-PROVERICYT 2016.

Estudiante de Maestría adscrito a la Unidad de Infectología Molecular del Laboratorio de Inmunología y Virología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL desde agosto de 2017. Colaboración con el Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la UANL del 1 abril de 2019 al 31 de mayo de 2019.